

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-505988

(43)公表日 平成9年(1997)6月17日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 府内整理番号 | F I | | |
|---------------------------|-------|---------|----------------|---------|---|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | 9162-4B | C 1 2 N 15/00 | Z N A A | |
| A 2 3 L 1/236 | | 9358-4B | A 2 3 L 1/236 | | A |
| C 0 7 K 14/405 | | 9356-4H | C 0 7 K 14/405 | | |
| C 1 2 P 19/02 | | 7432-4B | C 1 2 P 19/02 | | |
| // C 1 2 N 9/88 | | 9152-4B | C 1 2 N 9/88 | | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全164頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------|-----------------------------|
| (21)出願番号 | 特願平7-511303 |
| (86) (22)出願日 | 平成6年(1994)10月15日 |
| (85)翻訳文提出日 | 平成8年(1996)4月15日 |
| (86)国際出願番号 | P C T / E P 9 4 / 0 3 3 9 7 |
| (87)国際公開番号 | W O 9 5 / 1 0 6 1 6 |
| (87)国際公開日 | 平成7年(1995)4月20日 |
| (31)優先権主張番号 | 9 3 2 1 3 0 1 . 5 |
| (32)優先日 | 1993年10月15日 |
| (33)優先権主張国 | イギリス (GB) |
| (31)優先権主張番号 | 9 3 2 1 3 0 2 . 3 |
| (32)優先日 | 1993年10月15日 |
| (33)優先権主張国 | イギリス (GB) |

| | |
|---------|--|
| (71)出願人 | ダニスコ エイ／エス デンマーク国 コペンハーゲン ケイ デ ィーケイー1001, ピー. オー. ボックス 17, ランゲプロガード 1 |
| (72)発明者 | ユ, シューケン スウェーデン国 マルモ エスー212 40, グナー ヘジデマンス ガータ 29 |
| (72)発明者 | ボジュセン, カーステン デンマーク国 アレロッド ディーケイー 3450, フビデフスペ 13 |
| (74)代理人 | 弁理士 山本 秀策 |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 1, 5-D-アンヒドロフルクトース調製のための α -1, 4-グルカンリアーゼの使用

(57)【要約】

糖1, 5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法が記載される。この方法は、 α -1, 4-グルカンを、 α -1, 4-グルカンリアーゼで処理する工程を包含する。ここで、この酵素は実質的に純粋な形態で使用される。好ましい実施態様において、グルカンが、 α -1, 4-結合以外の結合および α -1, 4-結合に加えて結合を含有する場合、 α -1, 4-グルカンリアーゼが、他の結合を破壊し得る適切な試薬と協同して使用される。

【特許請求の範囲】

1. α -1,4-グルカンを酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼで処理する工程を包含する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法であつて、該酵素が実質的に純粋な形態で使用されることを特徴とする方法。
2. 前記グルカンが前記 α -1,4-結合以外の結合および α -1,4-結合に加えて結合を含有する場合、前記 α -1,4-グルカンリニアーゼが他の結合を破壊し得る適切な試薬と協同して使用される、請求項1に記載の方法。
3. 前記グルカンがデンプンであり、かつヒドロラーゼ、好ましくはグルカノヒドロラーゼが前記 α -1,4-グルカンリニアーゼと協同して使用される、請求項2に記載の方法。-
4. 前記ヒドロラーゼが、ブルラナーゼまたはイソアミラーゼの少なくとも1つである、請求項2または請求項3に記載の方法。
5. 前記 α -1,4-グルカンリニアーゼが、支持体に結合しているか、より好ましくは溶解された形態である、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. 前記酵素が、菌類、好ましくは*Morchella costata*または*Morchella vulgaris*から、または菌類感染藻類、好ましくは*Gracilariaopsis lemaneiformis*から、または藻類単独、好ましくは*Gracilariaopsis lemaneiformis*からのいずれかで単離される、請求項1から5のいずれかに記載の方法。
7. 前記酵素が、菌類から、または菌類感染藻類から、または藻類単独から、該酵素によって分解されないゲルを使用して単離および／またはさらに精製される、請求項6に記載の方法。
8. 前記ゲルが、デキストリンまたはその誘導体に基づく、好ましくは該ゲルがシクロデキストリンである、より好ましくは β -シクロデキストリンである、請求項7に記載の方法。
9. 前記酵素が、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列あるいはそれらの任意の変異体を含む、請求項1から8のいずれかに記載の方法。
10. 前記酵素が、該酵素をコードするヌクレオチド配列を発現させることによ

り得られる、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法。

1 1 . 前記ヌクレオチド配列が、DNA配列である、請求項 1 0 に記載の方法。

1 2 . 前記DNA配列が、配列番号 3 、または配列番号 4 、または配列番号 7 、または配列番号 8 の任意のDNA配列に同一な、または相補的な、または実質的に相同意性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

1 3 . 前記デンプンが、高濃度で使用される、例えば約 25%までの溶液で使用される、請求項 3 から 1 2 のいずれかに記載の方法。

1 4 . 前記基質が、緩衝液の存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の方法。

1 5 . 前記基質が、少なくとも実質的に純粋な水の存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の方法。

1 6 . 前記基質が、補因子の非存在下で前記酵素を用いて処理される、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

1 7 . 前記酵素が、アミロベクチンまたはデキストリンと組み合わせて使用される、請求項 1 から 1 6 のいずれかに記載の方法。

1 8 . α -1,4-グルカンを酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼで処理する工程を包含する、糖 1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法であって、該酵素が、配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 2 のアミノ酸配列、または配列番号 5 のアミノ酸配列、または配列番号 6 のアミノ酸配列、あるいはその任意の変異体を含むことを特徴とする方法。

1 9 . 本発明の方法で調製される、糖 1,5-D-アンヒドロフルクトース。

2 0 . 反応媒体の疎水性を増加させて、GL酵素の安定性および活性を増加させ得る、試薬の使用。

2 1 . 抗酸化剤としてのAFの使用。

2 2 . 甘味料としてのAFの使用。

【発明の詳細な説明】

1,5-D-アンヒドロフルクトース調製のための α -1,4-グルカンリーゼの使用

本発明は酵素、特に α -1,4-グルカンリーゼ(「GL」)の使用に関し、 α -1,4-グルカンを基礎とした基質から1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)を調製する。

本発明は糖、特に1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)を、抗酸化剤として、特に食料品および飲料の抗酸化剤として使用することにも関する。

本発明は1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)の甘味料として、特に食料品および飲料の甘味料として、好ましくはヒトの食料品および飲料としての使用に関する。

FR-A-2617502およびBanteら、(Phytochemistry (1988) vol. 27 No. 11 pp3401-3403)は*Morchella vulgaris*における1,5-D-アンヒドロフルクトース(「AF」)の見かけの酵素反応による產生について報告している。このAFの生産量は非常に少ない。可能な酵素反応に言及しているのにもかかわらず、これらの2つの文献は、塩基配列の情報はもちろんのこと、いかなる酵素についてのアミノ酸配列も示していない。これらの文献は、AFが抗生素質ピロンミクロテシン(pyronine microthecin)の調製のための前駆体になり得ることを報告する。

Yuら、(Biochimica et Biophysica Acta (1993) vol 1156 pp313-320)は紅海藻からのGLの調製およびAFを生産するために α -1,4-グルカンを分解するGLの使用について報告している。このAFの生産量は非常に少ない。GL酵素に言及するのにも関わらず、この文献は同酵素をコードする塩基配列の情報はもちろんのことその酵素についてのいかなるアミノ酸配列データも示していない。この文献はGLの供給源は藻類であることも示唆している。

代表的な α -1,4-グルカンを基礎とした基質はデンプンである。今日、デンプンは工業における広い使用を見出している。これは主にこれらが安価な原材料であるからである。

デンプン分解酵素は種々のカテゴリーに分類し得る。デンプンヒドロラーゼは

グルコースまたはグルコースオリゴマーを生成する。デンプン分解酵素の第二の群は、無機リン酸の存在下でデンプンからグルコース-1-リン酸を生成するホスホリラーゼである。

AFはまた、化学的に合成されてきた (Tetrahedron Letters Vol 21 pp1429-1432のLichtenthalerの研究を参照のこと)。しかし、この化学的合成には多くの数の工程が含まれ、そして多量のAFを生成させない。

AFを生成させるこの化学的合成経路は、それゆえ大変高価である。

それゆえ、安価でかつ容易な方法、ならびに多量のAFを生成し得る方法でAFを調製し得るプロセスが必要である。

さらに、抗酸化剤は代表的には、食料品などの物質に酸素がいかかる有害な影響を及ぼすことも防止するために使用される。一般的に使用される2つの抗酸化剤は、GRINDOX 142およびGRINDOX 1029である。これらの抗酸化剤は多くの成分を含み、そして製造するには非常に高価である。

それゆえ、より単純でより安価な形態の抗酸化剤を有する必要がある。

さらに、甘味料はしばしば食料品および飲料の調製に使用される。しかし、多くの甘味料は高価であり、調製が複雑である。

それゆえ、より単純でより安価な形態の甘味料を有する必要がある。

本発明では、 α -1,4-グルカンを酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼで処理する工程を包含する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法を提供する。ここでこの方法は、酵素が実質的に純粋な形態で使用されることにより特徴付けられる。

好ましくは、グルカンが α -1,4-結合以外の結合、および α -1,4-結合に加えて結合を含有する場合、 α -1,4-グルカンリニアーゼを、他の結合を破壊し得る適切な試薬（ヒドロラーゼ、好ましくはグルカノヒドロラーゼなど）と協同して使用する。

好ましくは、グルカンは、デンプンあるいは化学的または酵素的に調製されるデンプン画分である。酵素的に調製される場合は、反応は α -1,4-グルカンリニアーゼを添加する前に行われ得るか、または反応は同時に行われ得る。適切な試薬は、補助酵素(auxiliary enzyme)であり得る。好ましい補助酵素は α -または β -アミラーゼである。好ましくは、脱分枝酵素が使用される。より好ましくは補助

酵素はブルラナーゼ (pullanase) またはイソアミラーゼの少なくとも1つである。

好ましくは、 α -1,4-グルカンリニアーゼは支持体に結合しているか、より好ましくは、不溶性の形態である。

好ましくは、酵素は菌類 (好ましくは、*Morchella costata* または *Morchella vulgaris*) から、または菌類感染藻類 (好ましくは、*Gracilariopsis lemaneiformis*) から、あるいは藻類単独 (好ましくは *Gracilariopsis lemaneiformis*) からのいずれかで単離される。

好ましくは、酵素は菌類から、または菌類感染藻類から、あるいは藻類単独から、この酵素によって分解されないゲルを使用して、単離および／または精製される。

好ましくは、ゲルはデキストリンまたはその誘導体に基づく。

好ましくは、ゲルはシクロデキストリン、より好ましくは、 β -シクロデキストリンである。

好ましくは、酵素は配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列あるいはそれらの任意の変異体を含む。

別の好ましい実施態様では、酵素は配列番号9～11のいずれかに示したアミノ酸配列またはその任意の変異体を含む。

用語「その任意の変異体」は、その結果として生じる酵素がリニアーゼ活性を有するという条件で、配列からの、あるいは配列に対しての、任意の少なくとも1アミノ酸の置換、多様性、修飾、置き換え、欠失、または付加を意味する。

好ましくは、酵素はアミロベクチンまたはデキストリンと組み合させて使用される。

好ましくは、酵素はこの酵素をコードするヌクレオチド配列の発現から得られる。

好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列である。

好ましくはDNA配列は、配列番号3、または配列番号4、または配列番号7、または配列番号8のいずれかのDNA配列に同一、または相補的、または実質的相

同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を含む。

別の好ましい実施態様では、DNA配列は、配列番号12～14に示す配列に同一、または相補的、または実質的相同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む、任意の配列を含む。

表現「実質的相同性」は、構造および／またはヌクレオチド成分および／または生物学的活性に関する相同性を含有する。

表現「任意の適正なコドン置換を含む」は、生じる酵素がリアーゼ活性を有するという条件で、同じアミノ酸をコードする他のコドンとの任意のコドンの置き換えまたは置換、あるいはコドンの任意の付加または削除を包含する。

他の言葉で言えば、本発明はまた、その中で少なくとも1ヌクレオチドが欠失、置換または修飾される、あるいはその中で付加的な少なくとも1ヌクレオチドが挿入され、グルカンリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、修飾されたDNA配列を含有する。好ましくは酵素は、増加したリアーゼ活性を有する。

好ましくは、デンプンは（例えば、約25%溶液までの）高濃度で使用する。

好ましくは、基質を緩衝液の存在下で酵素を用いて処理する。

より好ましくは、基質を実質的に純粋な水の存在下で酵素用いて処理する。

好ましくは、基質を補因子の非存在で酵素を用いて処理する。

本発明では、 α -1,4-グルカンを酵素 α -1,4-グルカンリアーゼで処理する工程を含有する、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法も提供する。ここでこの方法は、酵素が配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号5のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列、または配列番号9～11のアミノ酸配列のいずれか、あるいはその任意の変異体を含むことを特徴とする。

本発明では、本発明の方法によって調製される場合の糖1,5-D-アンヒドロフルクトースも提供される。

本発明の方法によって調製されたAFは、 ^{13}C NMRにより確認され、特徴付けられた。

本発明の方法の一つの鍵となる有利性は、糖1,5-D-アンヒドロフルクトースを、従来よりずっと大量に、および既知のプロセスよりも比較的容易かつ安価な方

法

で調製し得るということである。例えば、糖は今やほんのごくわずかな量（例えば、マイクログラム量）しか生成され得なかつた先行技術の方法に比べて、例えば、100g以上（例えば、500g）の収量で調製され得る。

GLにより触媒され得る代表的な反応は以下のよう要約される：

- 1). アミロベクチン-----→ AF + 限界デキストリン
- 2). アミロース-----→ AF + 限界デキストリン
- 3). デキストリン-----→ AF + グルコース

反応1)では、2つの生成物の比率はアミロベクチンの構造あるいは α -1,6-グルコシド結合のアミロベクチン分子中の分布に依存する。

反応2)および3)では、生成物の比率は基質の重合度(DP)数に依存する。反応3では、AFとグルコースとの間の比率はDPに依存する。例えば、デキストリンが10グルコース単位を含有する場合、AF:グルコース比は9:1である。

本発明の別の有利性は、 α -1,4-結合以外の結合を含むグルカンが、実質的に分解され得ることである（従来は、一部のみの分解が達成された）。1,5-D-アンヒドロフルクトース前駆体の実質的な分解は1,5-D-アンヒドロフルクトースの収量を増加に導く1つの要因である。

他の有利性は、AFは天然の基質であり、それゆえヒトへの用途のための潜在力を有する。例えば、AFをAFデヒドローゼによって抗生物質ミクロテシンに変換し得る。抗生物質は食物生物保存(bio-preservation)におけるそれらの使用が知られており、これは食物工学では重要な領域である。しかし今まで、AFならびにミクロテシンの調製には数多くの不利性がある。例えば、ほんの少量しか生成され得なかつた。また、このプロセスには経費がかかった。

本発明は、AF、およびミクロテシンなどの他の生成物の、より多くの生産、およびずっとより安価な生産を提供することにより、これらの問題を克服する。この点では、グラムからキログラム量のAFを調製可能である。

さらなる有利性は、リアーゼは4℃で少なくとも1年間は安定であり、また活性を損なうことなく凍結乾燥し得る。

別の有利性は、リーゼがデンプンから直接AFを生成し、そしていかなる補助酵素の存在も必要としないということである。

別の有利性は、酵素を純水中で使用し得るということである。この結果は大変驚くべきことである。

本発明のリーゼの単純な特性に基づいて、AFの生産経費がグルコースの生産経費に匹敵することが期待され得る。本発明のリーゼが、一般に非常に高価である補助酵素の存在を、なんら必ずしも要求しないことが、特に有利である。

一般に、 α -1,4-グルカンをこの酵素の基質として利用し得る。

好ましい基質として、デンプンが使用される。

好ましいプロセスでは、可溶性またはゼラチン化したデンプンまたはデンプン加水分解物を使用する。デンプン加水分解物は化学的にも酵素的にも調製し得る

酵素を部分的にデンプンを分解するために使用する場合は、この酵素をリーゼまたは同時に添加され得る他の追加のデンプン分解試薬（例えば、酵素のグルカノヒドロラーゼ）を添加する前に添加し得る。

リーゼはグルカンをAFに変換する。この酵素は非還元末端から基質に結合し、還元糖だけを変換しないでおく。残ったグルコースは公知の方法により除去し得、その方法のいくつかは本明細書に記載されている。

ここで記載した反応を使用して、純粋なAFを生成し得、また大量に生成し得る

一つの実施態様では、 α -1,4-グルカンリーゼを菌類感染藻類（例えばGracilaria lemaneiformis）から β -シクロデキストリン Sepharoseでのアフィニティーコロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5でのイオン交換コロマトグラフィー、およびSuperose 12カラムでのゲル通過によって精製する。精製した酵素は α -1,4-グルカンから1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

菌類感染 Gracilaria lemaneiformis から単離した菌類のリーゼは、アミロベクチンを使用した場合、3.5~7.5の至適pH、50°Cの至適温度、および3.9のp

Iを有することで特徴付けられる。

別の実施態様では、 α -1,4-グルカンリアーゼを菌類 *Morchella costata* から β -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティクロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィー、および Superose 12カラムでのゲル濾過によって精製する。精製した酵素は、 α -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

この菌類のリアーゼは、3～9 の pH 勾配を有するゲルでの等電点電気泳動で測定したところ、5.4付近の pI を示す。8～25% の勾配を有するゲルでの SDS-PAGE により測定したところ、分子量は 110 kDa であった。この酵素は pH 5～7 の範囲で至適な pH を示した。至適温度は 30～45℃ の間であることが見出された。

別の実施態様では、 α -1,4-グルカンリアーゼは菌類 *Morchella vulgaris* から β -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティクロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィー、および Superose 12カラムでのゲル濾過によって精製する。精製された酵素は、 α -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

別の実施態様では、 α -1,4-グルカンリアーゼは藻類（例えば *Gracilariaopsis lemaneiformis*）から β -シクロデキストリン Sepharose でのアフィニティクロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5 でのイオン交換クロマトグラフィー および Superose 12カラムでのゲル濾過によって精製する。精製された酵素は α -1,4-グルカンから 1,5-D-アンヒドロフルクトースを生成する。

本発明によるいくつかの GL 酵素についての、リアーゼ触媒反応の代表的な至適 pH および 温度は以下の通りである：

| GL供給源 | 至適pH | 至適pH範囲 | 至適温度 |
|--------------------------------------|------|---------|------------------------|
| <i>M. costata</i> | 6.5 | 5.5-7.5 | 37°C;40°C ^a |
| <i>M. vulgaris</i> | 6.4 | 5.9-7.6 | 43°C;48°C ^a |
| 菌類感染 | | | |
| <i>Gracilariaopsis lemaneiformis</i> | 3.8 | 3.7-4.1 | 40°C;45°C ^a |

^aグリコーゲンを基質として用いて測定したパラメーター；他のパラメーターはアミロペクチンを基質として用いて測定した。

本発明の酵素はアミロースおよびアミロベクチンを1,5-アンヒドロフルクトースに変換する。

試験したマルトサッカリドの中で、本発明者らはこのリアーゼがマルトースに対して低い活性を示し、マルトトリオースおよびマルトヘプタオースに対してより低い活性を示し、マルトテトラオースおよびマルトペンタオースに最高の活性を示すことを見出した。この酵素は、これらのマルトサッカリドについては10 g/mlの濃度までは基質阻害を示さなかった。

それぞれの好ましい供給源由来の酵素は、配列決定し、アミノ酸の配列を後に示した。この酵素をコードするDNA配列も後に示した。

それゆえ本発明は、新規なデンプン分解酵素（すなわち新規な α -1,4-グルカノリーゼ）について記載する。これは初めて精製され、特徴付けられた酵素である。

上述したように、本発明はAFのいくつかの特定の使用にも関する。

特に、本発明は1,5-D-アンヒドロフルクトース（「AF」）を、抗酸化剤として、特に食料品および飲料の抗酸化剤として使用することにも関する。

それゆえ、本発明では、1,5-D-アンヒドロフルクトース（「AF」）の抗酸化剤としての使用が提供される。

好ましくは、AFは食用物質であるか、または食用物質中で使用される。

好ましくは、AFは食料品または飲料中で、あるいは食料品または飲料として使用される。

好ましくは、AFは他の抗酸化剤と組み合わせて使用する。

好ましくは、AFは本発明の方法に従って調製される。

抗酸化剤としてAFを使用することの主な有利性は、これが天然の産物であること、代謝されないこと、製造が容易であること、可溶性であること、そして一般に無毒であることである。

好ましい実施態様では、それゆえ本発明は、食物および非食物目的のために魅力的な水溶性の抗酸化剤として使用し得る、純粹なAFを酵素的に調製することに関する。適用例において、食物調製における抗酸化剤としてのAFの使用を示す。

付随の実施例において、AFが既知の高品質な市販の食物抗酸化剤に匹敵することが理解される。

非食物の例は、重合化学でのポリマー合成時の酸素除去剤としての使用を包含する。また、AFは生分解性プラスチックの合成に使用し得る。

実験は、AFが有効な還元剤（抗酸化剤）であり得ることを示した。なぜならAFは3,5-ジニトロサリチル酸を3-アミノ-5-ニトロサリチル酸に容易に還元し得るからである。

AFは天然の基質であり、それゆえ受容可能な抗酸化剤として使用される莫大な潜在性を有する。AFは、AFデヒドラーーゼによって抗生物質ミクロテシンに変換され得る。抗生物質は、食物生物工学の重要な分野である食物生物保存におけるその使用が知られている。

別の局面では、本発明はまた、1,5-D-アンヒドロフルクトースの甘味料としての、特に食料品および飲料、好ましくはヒトの食料品および飲料の甘味料としての使用に関する。

それゆえ、本発明のこの局面では、1,5-D-アンヒドロフルクトースの甘味料としての使用が提供される。

好ましくは、AFはヒトの食料品および飲料として、あるいはヒトの食料品および飲料中で使用される。

AFは、5%溶液または100mg/kgから500mg/kgなどの所望の量で使用され得る。

AFを甘味料として用いる有利性は、これが天然の産物であるということ、一般に無毒であること、水溶性であること、代謝されないこと、および生成が容易であることである。

それゆえ本発明はまた、甘味料としてのAFの新規な適用に関する。

好ましくは、AFは本発明の方法によって調製される。

本発明のさらなる局面は以下を包含する：

菌類感染藻類、菌類、または藻類単独から酵素を単離することを含有する酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼ(GL)の調製方法；

配列番号1、または配列番号2、または配列番号5、または配列番号6のアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の変異体を含む酵素。

配列番号9、または配列番号10、または配列番号11のアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の変異体を含む酵素；

酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼをコードするヌクレオチド配列、好ましくは、ここでその配列が自然環境に存在しない（すなわち、この酵素を発現し得る細胞生物のゲノムの一部を形成しない）、好ましくは、ここでヌクレオチド配列はDNA配列である；

DNA配列が配列番号3、または配列番号4、または配列番号7、または配列番号8のいずれかに同一である、または相補的である、または実質的相同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を少なくとも含むヌクレオチド配列、好ましくはここでこの配列が単離された形態である；

DNA配列が配列番号12、または配列番号13、または配列番号14のいずれかに同一である、または相補的である、または実質的相同性を有する、または任意の適切なコドン置換を含む配列を少なくとも含むヌクレオチド配列、好ましくはここでこの配列が単離された形態である；および、

酵素（好ましくはGL）を精製するための β -シクロデキストリンの使用。

本発明の他の好ましい実施態様は、以下のいずれかを含む：本明細書に記載のDNA配列を導入する結果としてAFを生産する能力を有する形質転換された宿主生

物；微生物である形質転換された宿主生物、好ましくは宿主生物は、細菌、糸状菌、菌類および酵母からなる群から選択され；好ましくは宿主生物は、*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma* *Hansenula*, *Pichia*, *Bacillus* *Streptomyces*, *Escherichia*（例えば、*Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Escherichia coli*）からなる群から選択され；糖1,5-D-アンヒドロフルクトースの調製方法、この方法は酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼをコードするヌクレオチド配列を発現する形質転換された宿主生物の使用を含み、好ましくはヌクレオチド配列はDNA配列であり、好ましくはDNA配列は本明細書に記載の配列の1つである；本明細書に記載のヌクレオチド配列を取り込んだベクター、好ましくはベクターは複製ベクターであり、好ましくはベクターはプロモーター配列から下流のヌクレオチド配列を含有している発現ベクターであり、好ましくはこのベクターは（耐性マーカーなどの）マーカーを含有している；そのようなベクターで形質転換された細胞生物または細胞株；産物 α -1,4-グルカンリニアーゼあるいは同酵素をコードする任意のヌクレオチド配列または一部分を生産する方法であり、この方法はそのようなベクターで形質転換されたそのような生物（または細胞株由来の細胞）を培養する工程、および産物を回収する工程を含有する。

特にこの発現系では、酵素は、好ましくは精製を容易にするように分泌されるべきである。そのために成熟酵素をコードするDNAを、選択した宿主由来のシグナル配列、プロモーターおよびターミネーターに融合させる。

*Aspergillus niger*における発現のため、*gpdA*(*Aspergillus nidulans*のグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドログナーゼ遺伝子由来)プロモーターおよびシグナル配列を成熟リニアーゼをコードするDNA(例えば配列番号3または配列番号4)の5'末端に融合する。*A. niger*の*trpC*遺伝子のターミネーター配列をその遺伝子の3'末端におく(Punt, P.J.ら、(1991):J.Biotech. 17, 19-34)。この構築物を*E. coli*のための複製オリジンおよび選択オリジンならびに*A. niger*のための選択マーカーを含むベクターに挿入する。*A. niger*のための選択マーカーの例としては、*amdS*遺伝子、*argB*遺伝子、*pyrG*遺伝子、*hygB*遺伝子、*BmIR*遺伝子などがあ

り、すべて形質転換体の選択に用いられてきた。このプラスミドを *A. niger* に形質転換し得、そして成熟リーゼを形質転換体の培養液中から回収し得る。最後に、この構築物を、培養液中でのリーゼのタンパク質分解を減少されるためにプロテアーゼ欠損株に形質転換し得る (Archer D.B. ら、(1992): Biotechnol. Lett. 14, 357-362)。

宿主として *Aspergillus niger* のかわりに、それらについて良好な発現系が公知である、以下のような他の工業的に重要な微生物を使用し得る; *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces* sp., *Hansenula* sp., *Pichia* sp., *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., または *E. coli*。

以下の試料をブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)、23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, AB2 1RY に 1994 年 6 月 20 日に

寄託した:

プラスミド pGL1 保有 *E. coli* (NCIMB 40652) - [参考 DH₅α-pGL1]; および
プラスミド pGL2 保有 *E. coli* (NCIMB 40653) - [参考 DH₅α-pGL2]。

以下の試料はブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)、Dunstaffnage Marine Laboratory PO Box 3, Oban, Argyll, Scotland, United Kingdom, PA34 4AD に 1994 年 10 月 11 日に寄託の承認がされた。

菌類感染 *Gracilariaopsis lemaneiformis* (CCAP 1373/1) - [参考 GLQ-1 (Qingdao)]。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物 NCIMB 40652 または寄託物 NCIMB 40653 の対象であるプラスミドに存在する GL コード配列の発現により取得し得る GL 酶素; および寄託物 CCAP 1371/1 の対象である菌類感染藻類から取得し得る GL 酶素を包含する。

以下の試料をブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB)、23 St. Machar Drive, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, AB2 1RY に 1994 年 6 月 20 日に

char Drive, Aberdeen, Scotland, United Kingdom, AB2 1RYに1994年10月3日
に寄託した：

プラスミド pMC 保有 E. coli (NCIMB 40687) - [参考 DH5 α - pMC] ;

プラスミド pMV1 保有 E. coli (NCIMB 40688) - [参考 DH5 α - pMV1] ; および

プラスミド pMV2 保有 E. coli (NCIMB 40689) - [参考 DH5 α - pMV2]。

プラスミド pMC は、 Morchella costata から作製されたゲノムライブラリーから
単離された 4.1 kb のフラグメントを含有する pBluescript II KS である。このフ
ラグメントは α -1,4-グルカンリニアーゼをコードする遺伝子を含有する。

プラスミド pMV1 は、 Morchella vulgaris から作製されたゲノムライブラリーか
ら単離された 2.45-kb のフラグメントを含有する pBluescript II KS である。この
フラグメントは α -1,4-グルカンリニアーゼをコードする遺伝子の 5' 末端を含有す
る。

プラスミド pMV2 は、 Morchella vulgaris から作製されたゲノムライブラリーか
ら単離された 3.1 kb のフラグメントを含有する pPUC19 である。このフラグメント

は α -1,4-グルカンリニアーゼをコードする遺伝子の 3' 末端を含有する。

以下の考察において、 MC は Morchella costata を表し、 MV は Morchella vulgaris を表す。

言及したように、 Morchella vulgaris 由来の GL コード配列は、 2 つのプラスミ
ドに含有された。 図 15 を参考にすると、 pMV1 は 454 位から 2902 位までのヌクレオ
チドを含有する；そして、 pMV2 は 2897 位から（これを含む）下流のヌクレオチド
を含有する。 図 12 および 13 を参考にすると、 コード配列を結合するために、 pMV2
を制限酵素 EcoRI および BamHI で消化し、 次に目的のフラグメントを制限酵素 EcoR
I および BamHI で消化した pMV1 に挿入し得る。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物 NCIMB 40687 または
寄託物 NCIMB 40688 および寄託物 NCIMB 40689 の対象であるプラスミドに存在する
GL コード配列の発現により取得し得る GL 酵素を包含する。

以下の試料はまたブダペスト条約に従い承認された寄託機関である The Culture
Collection of Algae and Protozoa (CCAP) 、 Dunstaffnage Marine Laboratory

P O Box 3, Oban, Argyll, Scotland, United Kingdom, PA34 4ADに1994年10月1
日に寄託の承認がされた。

菌類感染 *Gracilariaopsis lemaneiformis* (CCAP 1373/2) - [GLSC-1 (California)]。

このように、本発明の高度に好ましい実施態様は、寄託物CCAP 1373/2の対象である藻類から取得し得るGL酵素を包含する。

本発明はここで実施例によってのみ記載される。

以下の実施例において、添付する以下の図に言及する：

図1は、染色した菌類感染藻類を示す；

図2は、染色した菌類感染藻類を示す；

図3は、菌類菌糸の切片を示す；

図4は、菌類感染藻類の切片を示す；

図5は、菌類感染藻類の切片を示す；

図6は、pGL1のプラスミド地図を示す；

図7は、pGL2のプラスミド地図を示す；

図8は、配列番号3として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図9は、配列番号1と配列番号2とのアライメント(alignment)を示す；

図10は、顕微鏡写真である。

図11は、pMCのプラスミド地図を示す；

図12は、pMV1のプラスミド地図を示す；

図13は、pMV2のプラスミド地図を示す；

図14は、*Morchella costata*から得られたゲノムDNAのGLコード配列ならびに5'および3'の非翻訳領域を示す；

図15は、*Morchella vulgaris*から得られたゲノムDNAのGLコード配列ならびに5'および3'非翻訳領域を示す；

図16は、*Morchella costata*および*Morchella vulgaris*由来のGLコード配列ならびに非翻訳領域の比較を示す；

図17は、配列番号5として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図18は、配列番号6として表されるアミノ酸配列を示し、配列決定したペプチドフラグメントの位置を示す；

図19は、AFの存在または非存在での酸素消費のグラフを示す；そして、

図20はTLCプレートを示す。

より詳細には、図1は、*Gracilariaopsis lemameiformis*の上部および下部での菌類を表すCalcoflour White染色を示す(108×および294×)。

図2は、菌類を有する*Gracilariaopsis lemameiformis*のPAS/Anilinblue Black染色を示す。菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

図3は、藻類細胞の厚い壁(w)間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸(f)の縦方向で表面付近の切片を示す顕微鏡写真である。藻類のクロロプラスト中のチラコイド膜に留意(矢印)。

図4は、クローン2プローブを用いたアンチセンス検出(上列)が、次の切片のCalcoflour White染色(下列)により示される菌類に、限定されるようあることを示す(46×および108×)。

図5は、クローン2プローブを用いた強いアンチセンス検出が*Gracilariaopsis lemameiformis*内の菌類上に見出されたことを示す(294×)。

図6は、プラスミドpGL1の地図を示す。これは菌類に感染した*Gracilariaopsis lemameiformis*から作製したゲノムライブラリーから単離した3.8kbのフラグメントを含有するpBluescript II KSである。このフラグメントはα-1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

図7は、プラスミドpGL2の地図を示す。これは菌類に感染した*Gracilariaopsis lemameiformis*から作製したゲノムライブラリーから単離した3.6kbのフラグメントを含有するpBluescript II SKである。このフラグメントはα-1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子を含有する。

図9は、配列番号1(GL1)と配列番号2(GL2)とのアライメントを示す。GL1の総残基数は1088であり；GL2の総残基数は1091である。比較をするにあたって

構造-遺伝子的マトリックス (structure-genetic matrix) を用いた (Open gap cost: 10; Unit gap cost: 2) 図 9 中で、並べた二つの残基が同一であることを示す記号は「:」であり；並べた二つの残基が類似であることを示す記号は「.」である。「類似である」といわれるアミノ酸は A, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, Wである。全体で、同一が 845 アミノ酸 (すなわち 77.67%) 存在し；類似が 60 アミノ酸 (5.51%) 存在する。GL1に挿入したギャップの数は 3 であり、GL2に挿入したギャップの数は 2 である。

図 10 は、藻類の壁 (W) 間で成長した菌糸 (f) の顕微鏡写真である。藻類細胞中の紅藻デンプン (s) およびチラコイド (矢印) の粒子に留意のこと。

図 14において、総塩基数は 4726 であり、DNA配列組成は : 1336A ; 1070C ; 1051G ; 1269T である。ATG開始コドンを太字で示す。イントロンには下線を付す。終止コドンを斜体で示す。

図 15において、総塩基数は 4670 であり、DNA配列組成物は : 1253A ; 1072C ; 1080G ; 1265T である。ATG開始コドンを太字で示す。イントロンには下線を付す。終止コドンを斜体で示す。

図 16において、二つの並べられた配列は、MC(総残基数 1066) および MV(総残基数 1070) から得られた配列である。使用した比較マトリックス (comparison matrix) は、構造-遺伝的マトリックス (structure-genetic matrix) である (Open gap cost: 10; Unit gap cost: 2)。図中、二つの並んだ残基が同一であることを示す記号は「:」である。二つの並んだ残基が類似であることを示す記号は「.」である。「類似」であるといわれるアミノ酸は : A, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, W である。全体では、: 同一 : 920 (86.30%); 類似 : 51 (4.78%) である。MCに挿入されたギャップの数は 1 であり、MVに挿入されたギャップの数は 1 である。

付属の配列リストにおいて：配列番号 5 は、*Morchella costata* から得られた GL のアミノ酸配列である；配列番号 6 は、*Morchella vulgaris* から得られた GL のアミノ酸配列である；配列番号 7 は、*Morchella costata* から得られた GL のヌクレオチド配列である；配列番号 8 は、*Morchella vulgaris* から得られた GL のヌクレオチド配列である。

配列番号 5においては総残基数は1066である。GL酵素は以下のアミノ酸組成を有する：

| | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| 46 Ala | 13 Cys | 25 His | 18 Met | 73 Thr |
| 50 Arg | 37 Gln | 54 Ile | 43 Phe | 23 Trp |
| 56 Asn | 55 Glu | 70 Leu | 56 Pro | 71 Tyr |
| 75 Asp | 89 Gly | 71 Lys | 63 Ser | 78 Val |

配列番号 6においては総残基数は1070である。GL酵素は以下のアミノ酸組成を有する：

| | | | | |
|--------|--------|--------|--------|--------|
| 51 Ala | 13 Cys | 22 His | 17 Met | 71 Thr |
| 50 Arg | 40 Gln | 57 Ile | 45 Phe | 24 Trp |
| 62 Asn | 58 Glu | 74 Leu | 62 Pro | 69 Tyr |
| 74 Asp | 87 Gly | 61 Lys | 55 Ser | 78 Val |

実験

1 可溶性酵素系：

1.1. 菌類感染 *Gracilariaopsis lemameiformis* から単離したリアーゼの安定性および活性に及ぼすpHの影響

二つの緩衝系、すなわちHOAcおよびNaOAc、ならびにクエン酸ナトリウム（クエン酸を5 mMの濃度で）、37°Cで試験した。試験したpHの範囲は、pH 3からpH 5.2であった。このリアーゼは、3.6と4.2との間のpH範囲で最大の活性を示した。pH

3では、この酵素の安定性および活性は約90%減少した。pH 5.2では活性は約64%減少した。しかしこの酵素は、このpHではpH 3に比較してかなり安定であり、pH 5.2で得られたAFの収量はpH 3.8で得られたAFの収量の75%であった。HOAcおよびNaOAc緩衝液においての方がクエン酸緩衝液よりもいくぶんAFの収量が高かった。これは、AFのアッセイ法における二つの緩衝液（AFアッセイ混合液中、最終濃度は125 μM）のいかなる異なった影響によるものではない。

1.2. リアーゼの活性および安定性に及ぼす温度の影響。

この実験は最適pH範囲で行った。25°CではAFの生産は少なくとも9日間まで直線的であった。このことは、9日以内ではリアーゼの活性および安定性の損失が

なっかたことを示す。温度が上昇するにつれて、酵素の安定性は減少した。

この酵素の活性の、以下の温度での半減期は以下の通りであった。

30℃ 5日

37℃ 2.5日

40℃ 1日以下

50℃ 1日以下

1.3. このリアーゼの安定性およびAFの収量に及ぼす基質濃度の影響

アミロベクチンおよびデキストリンはリアーゼに対して安定化する効果を有することが観察されたが、最も小さな基質であるマルトースではこのような効果を有しなかった。このことは可溶性酵素系および固定化酵素系の両方について証明された。

AFの収量は、アミロベクチンの濃度が25%まで増加するにつれて増加した。デキストリンの場合は、濃度が30%を越えると、AFの収量は減少した(30%, 40%および50%を試験した)。

1.4. リアーゼの活性化および不活性化

活性化のために金属イオンは必要でないことが見出され、この酵素に触媒される反応は驚くほど純水中で進行し得た。反応混合液にEDTAを20mMまで添加して

も活性にはほとんど影響がないという事実は、明らかに本発明によるこのリアーゼ酵素の活性には、金属イオンが必要でないということを示す。

このことは、AFの精製工程で、水を反応媒体とする場合は、反応系から塩を除去するイオン交換クロマトグラフィーの工程を省き得ることを意味する。しかし、反応混合液にNaClを0.85%(0.145M)の濃度で含有すると、AFの収量を1倍まで増加し得る。

1.5. 基質特異性

可溶化デンプンは、デンプンの濃度が高くなる場合、冷却するにつれて固いゲルを形成する傾向がある。それゆえ、この α -1,4-グルカンリアーゼの基質として部分分解したデンプンを利用することは有利である。

*M. costata*から単離した1,4-グルカンリアーゼの、異なるオリゴサッカリドに

に対する特異性を試験した。オリゴサッカリドは、マルトース(G2)、マルトトリオース(G3)、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)、マルトヘキサオース(G6)、およびマルトヘプタオース(G7)であった。これらのオリゴサッカリドは水に 8 mg/ml の濃度で溶解した。この酵素アッセイは、150 μl の G2/G3/G4/G5/G6/G7 の基質、120 μl の 0.1 M MES pH 6.3 および 30 μl の精製した酵素を含有した。反応混合液は 30°C で 60 分間インキュベートした。後に、反応を 3 分間煮沸して停止させ、900 μl の無水エタノールを加えて沈殿させた。4°C で 20,000 × g で 5 分間遠心分離した後、上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、凍結乾燥した。凍結乾燥させた試料を 1000 μl の H₂O に溶解し、25 μl の試料を Dionex HPLC にコードする前に 0.22 μm Millipore フィルターで濾過した。

1.7. HPLC

分析手順

分析は、GPM-2ポンプおよびPED検出器（パルス電流検出モード（pulse-amperometric detection mode）で使用した）からなる Dionex 4500iクロマトグラフィーシステムで行った。

陰イオン交換カラムは Dionex の CarboPac PA-100 (4 × 250 mm) および CarboPac PA-100 ガードカラム (3 × 25 mm) であった。

溶離剤は 200 mM 水酸化ナトリウム (A)、500 mM 酢酸ナトリウム (B) および 18 M オームの脱イオン水 (C) であった。ポンプは方法番号 1 および方法番号 2 である 2 つの異なった方式でプログラムした。

方法番号 1:

| 時間、分 | 0.0 | 3.0 | 3.1 | 26.9 | 29.0 |
|------|-----|-----|-----|------|------|
| % A | 10 | 10 | 50 | 50 | 10 |
| % B | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 |
| % C | 90 | 90 | 50 | 18 | 90 |

方法番号 2:

| | | |
|-------------|-----|----|
| <u>時間、分</u> | 0.0 | 30 |
| % A | 10 | 10 |
| % B | 0 | 0 |
| % C | 90 | 90 |

標準品：

グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペントオース、マルトヘキサオース、およびマルトヘプタオース（すべてSigma）、ならびに1,5-アンヒドロフルクトースを標準品として用いた。すべての化合物を18 Mオームの脱イオン水に溶解し、使用前に0.22 μm Milliporeフィルターで濾過した。

1.7. 結果：

分析により、M. costataから単離した精製酵素は、実際に1,5-アンヒドロフルクトース形成のためにマルトオリゴサッカリドを基質1として利用し得るということが示される。

マルトースを基質として使用した場合、1,5-アンヒドロフルクトースはほとんど全く形成されなかつたが、他のマルトオリゴサッカリド(G3-G7)を使用した場合、多量のこの化合物が生成された。

より長いマルトオリゴサッカリドを使用した場合、より多量の1,5-アンヒドロフルクトースが得られたということが明らかである。

この観察は、リアーゼが基質の非還元末端側から1,5-アンヒドロフルクトースを生成し、末端のグルコース分子のみを変化させないという理論と、良好に完全に対応している。

1.8. AFの形成

M. costata由来のα-1,4-グルカンリアーゼは、デンプンを最終生成物の1,5-アンヒドロフルクトースに加水分解する。最終生成物は方法2のHPLCで示された。酵素アッセイは500 μlのアミロベクチン(20 mg/ml、水に溶解)、400 μlの0.1 M M

ES pH 6.3 および 100 μ l の精製した酵素を含有した。反応混合液を 30°C でインキュベートし、インキュベーションの 30 分または 120 分後に煮沸して反応を停止させた。高分子量のオリゴサッカリドを 3 倍量の無水エタノールを加えて沈殿させ、試料を前述のように遠心分離して凍結乾燥した。試料を 125 μ l H₂O に溶解し、そのうち 25 μ l を HPLC カラムにのせた。

HPLC の溶出プロフィールは、M. costata 由来の α -1,4-グルカンリアーゼが、デンプンの加水分解により 1,5-アンヒドロフルクトースを生成することを明らかに示す。インキュベーション 30 分後および 120 分後に等しい量の 1,5-アンヒドロフルクトースが見出され、このことはこの酵素の活性が、最終生成物である 1,5-アシヒドロフルクトースにより阻害されないことを示す。

この方法で調製された AF の ¹³C NMR スペクトル（水）は、以下の信号を生じさせる 1 つの主要な形態をとることを示す： δ 93.5 (カルテット (quart), C-2), 81.5 (CH, C-5), 77.7 (CH, C-3), 72.6 (CH₂, C-1), 69.8 (CH, C-4), 62.0 (CH₂, C-6)。帰属は H-H, C-H および C-H 2D 相関スペクトルに基づいた。

1.6. リアーゼのブルラナーゼおよびイソアミラーゼとの協同作用の影響

表 1 に見られるように、反応混合液にブルラナーゼを含有すると、基質として可溶性デンプンを使用するかアミロベクチンを使用するかに依存して、AF の収量が約 15~23% 明らかに增加了。

表 AFの生産におけるプルラナーゼとリアーゼの協同作用。

| 基質 | リーゼ [*] | プルラナーゼ [*] | AF 収量 (%) | Glc 収量 (%) |
|----------------|------------------|---------------------|-----------|------------|
| 可溶性 | | | | |
| デンプン | + | - | 51 | 0 |
| | - | + | 0 | 0.37 |
| | + | + | 66.0 | 3.9 |
| アミロペクチン | | | | |
| | + | - | 48.0 | 0 |
| | - | + | 0 | 0.33 |
| | + | + | 71.3 | 3.7 |

+ : 酵素添加, - : 酵素省略

反応混合液は、示したように0.3mlの水中の2%バレイショアミロベクチン(Sigma)または0.3mlの2%可溶性デンプン(Merck)、2μlのリアーゼならびに0.36単位プルラナーゼ(BM)を含有していた。

反応は30℃で1日行った。反応終了時に、試料をAFおよびGlcの分析に用いた

イソアミラーゼの場合は、このリアーゼの至適pHがPseudomonasのイソアミラーゼの至適pH(pH3.0~4.5)と重なるので有利である。しかし、問題はイソアミラーゼが過剰量の長鎖アミロースを生成することである。過剰量の長鎖アミロースは溶液中で沈殿し、それゆえもはやリアーゼの基質としては適切ではない。リアーゼのイソアミラーゼとの協同作用は、アミロースの鎖が長すぎない場合、効率

的であると期待され得る。

2. 固定化酵素系

スクシンイミド活性化Sephadose(Affigel 15ゲル,Bio-Rad)およびグルタルアルデヒド活性化シリカゲル(BM)を使用して、リアーゼの固定化を達成した。Affi

gel 15ゲルに固定化した後のリアーゼ活性の回収は40%~50%の間であった。固定化後にまだ活性であるが、立体障害のため（特にデンプンのような巨大分子の場合に）、基質に接近し得ないリアーゼもいくらか存在し得る。工業で使用される固定化酵素は、通常50%付近の活性回収を有する。

Affigel 15ゲル固定化リアーゼについての最も興味深いことは、pH5.5で安定性が大きく向上することである。カラムをこのpHで操作する場合、安定性は少なくとも16日間の長さであった。ブルラナーゼの至適pHがpH5.5付近であることを考慮すると、安定性におけるpHの変動は大変重要である。このことは、リアーゼおよびブルラナーゼが同じ物理化学的環境で同じ反応器で、効率的に協同作用するための必要条件である。可溶性のリアーゼは、3.6と4.2との間の至適pHを有し、このpH範囲ではブルラナーゼはほとんどあるいは全く活性を示さない。

シリカゲル固定化リアーゼでは、活性回収は非常に高く、80~100%付近であった。しかし、シリカゲル固定化酵素は、カラムをpH3.8あるいはpH5.5のいずれで操作しても安定でなかった。いくらかのリアーゼがシリカゲルビーズの表面に吸着していて、カラムを洗浄するたびにシリカゲルから徐々に放出された可能性がある。それゆえ、高い回収率とカラム活性の減少に寄与しているのは吸着したリアーゼであり得る。

3. AFの精製

3.1. リアーゼーアミロベクチン/可溶性デンプン系

この系では、反応系は反応終了時に、AF、限界デキストリン、リアーゼ、および緩衝塩を含有した。AFは巨大分子（限界デキストリンおよびリアーゼ）からエタノール沈殿（最終濃度50%）により分離した。沈殿されない低分子量のアミロベクチンは、Amicon YM3膜（カットオフ3,000）をウルトラフィルトレーーションして分離した。エタノールは、ロータリーエバボレーター内で40℃で蒸発させた。

緩衝塩を、混合イオン交換剤によりAFから除去した。精製した固体のAFは、凍結乾燥によって得られた。

3.2. リアーゼーブルラナーゼ/アミロベクチン/可溶性デンプン系。

この系では、最終産物は、AFおよびグルコースである。少なくとも実質的に純

粹な AF の試料を調製する場合は、副生成物であるグルコースを除去しなければならない。これは酵素法で達成し得る。最初にグルコースは、グルコースオキシダーゼによってグルコン酸および過酸化水素に変換される。

形成された H₂O₂ を除去するためにカタラーゼが必要である。H₂O₂ は AF を酸化して現時点では構造が未知の 2 つの化合物にする。AF 調製の際の他の夾雑物は、AF の酸化生成物である。AF は空気中の程度の酸素によって、特に高温、高濃度の AF 、および長時間の曝露において、徐々に酸化され得ることが観察された。

グルコン酸はイオン交換クロマトグラフィーによって緩衝塩とともに除去された。

この系では、低分子量のアミロベクチン分子は、あるいはウルトラフィルトレーションを使用する代わりに、アミログルコシダーゼによって加水分解され得る。

3.3. AF の純度の確認

AF 調製物の純度を、TLC、Dionex、および NMR によって確認した。

3.4. アンヒドロフルクトースの酸化防止活性の分析

電気化学的酸素消費：

方法

AF の活性を、メチルリノレートエマルジョンにおいて、Jorgensen および Skibsted (Z. Lebensm. Unters. Forsch. (1993) 196: 423-429) 記載を以下のように若干変更して検討した： pH=5.8 の 5.0 mM リン酸緩衝水溶中の液および乳化剤としての 0.2 w/w % Tween 20 中の、1.33 mM メチルリノレートエマルジョン 5.00 mL に、AF を以下の濃度で加えた： 0 、 15 、 146 、および 680 μM 。この系の酸化は、

最終濃度 0.26 mM の 50 μL 0.26 M メトミオグロビン (MMb) を添加することにより開始した。反応開始直後、試料を恒温化した (25.0 ± 0.1°C) 70 μL の閉鎖セルに注入し、系に酸素が拡散することを効果的に防いだ。酸素消費は、PC データ収集プログラムに連結した Clark 電極で測定した。相対的な酸素濃度 (%) を、30 秒ごとに記録した。

結果

異なる試料についての酸素消費量に対応する曲線を、図19に例示する。AFを添加しなかった試料については、酸素消費量における相対的減少が、試料を注入した直後に見られる。AFを含有する試料については、曲線が急に出現して酸素濃度が減少する前に、遅延相(lag-phase)が観察される。遅延相の後、AFを添加しない試料に比較してわずかな酸素消費速度の減少が観察される。最も多量のAFを含む試料が、最も長い遅延相を有するという傾向が観察される。なお、酸素消費速度はこれらの試料ではより低いので、これは対照(0 μ M)の傾斜角と比較して、より小さな傾斜角の曲線により見られる。

ESR分析

方法

ヒドロキシラジカルを、 H_2O_2 (0.17 mM)および $FeSO_4$ (4.8 μ M)を用いてフェントン反応によって生成した。生成したラジカルを5,5-ジメチル-1-ピロリンN-オキシド(DMPO, 9.7 mM)によって捕集した。AFを1.3 mMおよび6.3 mMの濃度で添加した。ローズマリー(*Rosmarinus officinalis L.*)の水溶性抽出物を0.25 mg/mlの濃度(グラムで、1.26 mMのAFに相当する)で分析した。測定は、以下のような分光光度計の設定で、120秒に室温(20 ± 1°C)で行い、300秒後に同一の反応混合液について繰り返した：中心磁場(center field)3475.60 G; 掃引幅 55 G; マイクロ波出力 20 mW; 変調周波数 100 kHz; 変調幅 1.01 G; 受信增幅比 1.00 · 10⁵; 変換時間 81.92 ms 時間定数 163.84 ms および掃引時間 83.89 s。

結果

生成されたヒドロキシラジカルをDMPOによって捕集した。スピニアダクト(spin adduct)は特徴的な1:2:2:1 ESRスペクトルを生じさせる。スペクトルのピーク高さは、生じたスピニアダクトの量に比例する。DMPOおよびAF両方の添加は、スピントラップとAFとの間での競合を生じさせる。ピーク高さの減少は、AFの良好な捕捉活性(scavenging activity)を示す。

表： ESRスペクトルのピーク高さ。 $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.17 \text{ mM}$ および $\text{Fe}^{2+} = 4.8 \mu\text{M}$

| アセトロフルクトース [mM] | ローズマリー抽出物 [mg/ml] | ピーク高さ [120 s] | ピーク高さ [300 s] |
|-----------------|-------------------|---------------|---------------|
| 0 | 0 | 2475 | 2780 |
| 1.3 | 0 | 2634 | 2545 |
| 6.3 | 0 | 1781 | 1900 |
| | | | |
| | | | |

1.3 mM AFの濃度では、ヒドロキシラジカルの捕捉活性は見られなかったが、6.3 mM AFでは、ピーク高さが減少し、これは生成されたヒドロキシラジカルの一部がAFにより捕捉されることを示す。

4. 抗酸化剤としてのAFの使用

実施例 4.1

50%マヨネーズにおける抗酸化剤としてのAFの使用

50%マヨネーズは、料理店および小売店の両方で、サラダ、オープンサンドなどに使用される。50%マヨネーズは低油含有であるので、低カロリー使用に適切である。

代表的なマヨネーズの組成は以下の通り：

大豆油 50.0%

タラゴン酢 4.0%

卵黄 3.5%

砂糖 3.0%

塩 1.0%

ソルビン酸カリウム 0.1%

水 35.2%

MAYODAN 602 3.0%

レモン香料 10251 0.2%

MAYODAN 602は、良質で安定な油の分散および要求される粘性を確保し、それゆえ50%マヨネーズに長い貯蔵期間を提供する。。

香料 10251は、マヨネーズに新鮮なレモンの風味を与える天然のレモン香料である。

代表的なマヨネーズは以下の方法で調製される：

1) MAYODAN 602、砂糖、および塩を乾燥混合する。粉末1対油2の割合で油中に分散させる。

2) 香料およびソルビン酸カリウムを水に加え、Korumaミキサーに注ぐ。1)を加える。

3) 卵黄を加える。

4) 減圧下で連続的に油を加える。

5) 油の2/3を(ゆっくり)加えた後、タラゴン酢を残りの1/3の油と混ぜ合わせ、加える。

以下のデータは、AFを抗酸化剤として加えた場合、公知の食物抗酸化剤であるGRINDOX 142およびGRINDOX 1029に匹敵することを示す。

GRINDOX 142 :

| | |
|--------------|---------------------|
| アスコルビルバルミテート | 10% |
| プロビルガレート | 20% |
| クエン酸 | 10% |
| 食物用乳化剤 | 60% |
| 25°Cでの形状 | ペースト |
| 色 | 灰色から薄茶色(pale brown) |
| 密度 | 1.1g/ml |

(全百分率は重量による)

GRINDOX 1029 :

| | |
|--------------|-----|
| アスコルビルバルミテート | 20% |
| 天然トコフェロール | 20% |

| | |
|---------|------------------|
| 食物用乳化剤 | 60% |
| 25℃での形状 | ペースト |
| 色 | 淡褐 (light brown) |
| 密度 | 1.0 g/ml |

(全百分率は重量による)

試験手順において、抗酸化剤を、抗酸化剤濃度が約 500 ppm の柄となるようにマヨネーズに添加した。次に、マヨネーズを純O₂を含有する 80℃ のボンベ熱量計においてた。そして、生成物が実質的に酸化し始めるまでの誘導期間を測定した。結果は以下のとおりである。

| 試料 : | <u>IP(時間)</u> |
|-------------------------------|---------------|
| 1. ブランク | 28, 0 |
| 2. +500 ppm GRINDOX 142 | 35, 0 |
| 3. +500 ppm GRINDOX 1029 | 33, 3 |
| 4. +550 ppm GRINDOX 1029 | 34, 3 |
| 5. +500 ppm 1,5-D-アンヒドロフルクトース | 32, 0 |

(IP時間 = 誘導期間)

これらの結果は、AFが優れた食物抗酸化剤であり、そして公知の食物抗酸化剤である GRINDOX 142 および GRINDOX 1029 に匹敵するということを示す。

実施例 4. 2

サラダドレッシングにおける抗酸化剤としての AF の 使用

50%油を含むヨーグルトサラダドレッシング

50%油を含むヨーグルトサラダドレッシングは、サラダ、ジャガイモ、生野菜サラダ、肉、魚および温野菜に使用される。

組成

| | |
|--------------|-------|
| 大豆油 | 50.0% |
| ヨーグルト (プレーン) | 39.0% |
| 酢 (10%) | 3.5% |
| 砂糖 | 3.0% |

| | |
|---------------|-------|
| 卵 黄 | 2.0% |
| 塩 | 1.0% |
| ソルビン酸カリウム | 0.1% |
| MAYODAN 525 | 1.4% |
| 酸マスキング香料 2072 | 0.02% |

MAYODAN 525は、独特の乳化安定性を与え、離液を防ぎ、均一な油分散と粘性を確保し、生産プロセスへの寛容を向上させ、長い保存期間を確保する。

香料 2072は天然物と同一の、酸マスキング香料であり、pH値に影響を与えることなく、酸味を減少させる。

プロセス

1. MAYODAN 525、砂糖、および塩を乾燥混合する。粉末 1 対油 2 の割合で油に分散させる。
2. 香料、ソルビン酸カリウム、およびヨーグルトを水に加え、Korumaミキサーに注ぐ。1)を加える。
3. 卵黄を加える。
4. 減圧下で連続的に油を加える。
5. 油の 2/3を（ゆっくり）加えた後、酢を残りの 1/3の油と混ぜ合わせ、加える
6. 必要に応じて香辛料を加える。

試験結果：

| 試料： | IP(時間) | PF |
|-------------------------|--------|------|
| 1. ブランク | 37.2 | 1.00 |
| 2. 500 ppm 無水フルクトース | 39.5 | 1.06 |
| 3. 800 ppm GRINDOX 1032 | 43.3 | 1.07 |
| (IP-誘導期間);(PF-保護期間) | | |

保護要素 (PF) :

温度ごとに以下のように定義される

PF = 抗酸化剤を加えた油の IP / 抗酸化剤を加えない油の IP

寿命延長 (life extension) (LE) (%) :

$$LE = (PF - 1.0) \times 100$$

6. α -1,4-グルカンリニアーゼの調製

緒言

本発明のさらなる実施態様に関して、AFの調製に使用する酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼは、菌類感染藻類、好ましくは菌類感染 *Gracilaria* *lemaneiformis*、より好ましくは菌類感染 Qingdao (中国) 由来の *Gracilaria* *lemaneiformis* から単離し得る。

あるいは、この酵素は菌類から得取され得る。例えば、菌類は *Discina perlat*a, *Discina parma*, *Gyromitra gigas*, *Gyromitra infula*, *Mitrophora hybrida*, *Morchella conica*, *Morchella costata*, *Morchella elata*, *Morchella hortensis*, *Morchella rotunda*, *Morchella vulgaris*, *Peziza badia*, *Sarcosphaera exigua*, *Disctotis venosa*, *Gyromitra esculenta*, *Helvella crispa*, *Helvella lacunosa*, *Leptopodia elastica*, *Verpa digitaliformis*, および *Morchella* の他種のいずれかであり得る。好ましくは菌類は *Morchella costata* または *Morchella vulgaris* である。

本発明のさらなる実施態様に関して、AFの調製に使用する酵素 α -1,4-グルカンリニアーゼは、藻類単独、好ましくは *Gracilaria* *lemaneiformis*、より好ましくは Santa Cruz (カリフォルニア) 由来の *Gracilaria* *lemaneiformis* から単離し得る。

最初の酵素精製は、Yuら (前出) に記載の方法により実施し得る。しかし、好ましくは、最初の酵素精製は、精製工程下で分解しない固体支持体を使用する、至適化された手順を含む。このゲル支持体は、標準的な実験室タンパク質精製設備に適合するという有利性を有する。この至適化した精製ストラテジーの詳細を、後に示す。精製はタンパク質精製のための公知の標準的な技術により終結される。

酵素の純度は、補足の電気泳動技術を使用して容易に確認し得る。

A. 供給源 = 菌類感染藻類

以下の配列情報を、下記のPCR反応のためのプライマーを作成するため、およびそれぞれのヌクレオチド配列から生成するアミノ酸配列を確認するために使用した。

菌類感染 Gracilariaopsis lemaneiformis 由来のペプチドから組み合わせたアミノ酸配列

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala
 Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn
 Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
 Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu
 Asn Ser Thr Glu Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp
 Tyr Lys Phe Gly Pro Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala

プライマー A および B を作成するために使用したアミノ酸配列 (27-34) (Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val)

プライマー A

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) TC(GATC) AA(CT) GT 128 種混合

プライマー B

ATG TA(TC) AA(CT) AA(CT) GA(CT) AG(CT) AA(CT) GT 64 種混合

プライマー C を作成するために使用したアミノ酸配列 (45-50) (Gly Gly His Asp Gly Tyr)

プライマー C

TA (GATC)CC (GA)TC (GA)TG (GATC)CC (GATC)CC 256 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

プライマー E を作成するために使用したアミノ酸配列 (74-79) (Gln Trp Tyr Lys Phe Gly)

プライマー E

GG(GATC) CC(GA) AA(CT) TT(GA) TAC CA(CT) TG 64 種混合

[配列は相補鎖に対応する。]

プライマー F1 および F2 を作成するために使用したアミノ酸配列 (1-6) (Tyr Arg Trp Gln Glu Val)

プライマー F1

TA(TC) CG(GATC) TGG CA(GA) GA(GA) GT 32 種混合

プライマー F2

TA(TC) AG(GA) TGG CA(GA) GA(GA) GT 16 種混合

第 1 回目の PCR 増幅から得られた配列 (クローン 1)

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCC
TCTTGGCGGC CACGACGGTT A

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
Gly His Asp Gly

第 2 回目の PCR 増幅から得られた配列 (クローン 1)

ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCC
TCTTGGTGGGA CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG
AGAATTGAC CGAACGNGAA TTGTACTTGC CCGTGCTGAC CCAATGGTAC
AAATTGGCC C

Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly
Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Thr Glu Asn Ser Thr Glu
Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Thr Tyr Lys Phe Gly Pro

第 3 回目の PCR 増幅から得られた配列 (クローン 2)

TACAGGTGGC AGGAGGTGTT GTACACTGCT ATGTACCAGA
 ATGCGGCTTT CGGGAAACCG ATTATCAAGG CAGCTTCCAT
 GTACGACAAC GACAGAAACG TTCGCGGCAC ACAGGATGAC
 CACTTCCTTC TCGGCAGACA CGATGGATAT CGTATTGT
 GTGCACCTGT TGTGTGGAG AATACAACCA GTCGCGATCT
 GTACTTGCT GTGCTGACCA GTGGTACAAA TTCGGCCC

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala Phe Gly Lys
 Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp
 Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val
 Trp Glu Asn Thr Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys
 Phe Gly

A. 1. Gracilariaopsis lemameiformis の細胞学的検討

A. 1. 1. 1 Gracilariaopsis lemameiformis における菌類感染の検出

中国で収集した *Gracilariaopsis lemameiformis* の切片は手で切断するかまたはパラフィン包埋した試料から切断した。切片化した試料を光学顕微鏡で注意深く検討した。菌類菌糸は *Gracilariaopsis lemameiformis* 内に明確に検出された。

Gracilariaopsis lemameiformis の葉状体は、高度に整然として、ほぼ対象の特徴を示す細胞から成る。*lemameiformis* の管状葉状体は大きい、無色の中心細胞、ならびにその周囲に伸長された、細長い梢円形の細胞、および小さい、丸い、赤く着色された周辺細胞から成る。全ての藻類細胞タイプは厚い細胞壁により特性づけられる。ほとんどの菌類菌糸は、大きな細胞の中心層および周辺層の中間に見出される。これらの細胞は長く円筒形であるため藻類細胞と明確に区別し得る。菌糸の成長は、高度に整然とした藻類細胞の間の不規則性として観察された。最も頻繁な菌糸の方向は、藻類の葉状体の主軸に沿った向きである。中心および周辺に向かう側枝がいくつかの場合で検出される。菌糸は藻類の内性／着生第二世代と混同され得ない。

Calcofluor White はキチンおよびセルロースを含有する組織を染色することが知られている。キチンとの反応は、4個の共有結合した末端の n-アセチルグルコ

サミン残基を要求する。セルロースは、いくつかの藻類では微量に存在し得るが、ほとんど高等植物に限定されていることが一般に受け入れられている。さらにキチンは *Gracilaria* 内には存在しないことが公知である。

Calcofluor White は切片化した *Gracilaria* *lemaneiformis* の試料中の菌類菌糸の細胞壁に相当する領域を染色することが見出された。

紫外線下で観察すると、菌糸は *Gracilaria* 組織の淡青色の背景に対して明確な白色を示す（図 1 を参照のこと）。キチンは *Gracilaria* には存在しないが、ほとんどの菌類においては細胞壁の主成分である。これらの観察に基づき、本発明者は検査した藻類は菌類に感染していると結論する。検討した *Gracilaria* *lemaneiformis* 切片の下部の 40% は、菌類菌糸に感染していることが見出された。藻類の先端では検査した *Gracilaria* *lemaneiformis* の切片の 25% が感染していることが見出された。

Periodic acid Schiff (PAS) および *Aniline blue black* での *Gracilaria* *lemaneiformis* 切片の染色は、藻類細胞と比較して菌類細胞内の頗著に高い炭水化物含有を示した（図 2 を参照のこと）。*Safranin O* および *Malachit Green* は、菌類に感染した高等植物に見出されるのと同じ菌類細胞の呈色反応を示した。

Acridin Orange と *Gracilaria* *lemaneiformis* 切片との反応は、明確に菌類の不規則な成長を示した。

A.1.1.2 電子顕微鏡検査

Calcofluor White を用いて菌類を検出した、15 μm の厚さの切片を有するスライドを 2% OSO₄ で固定し、水で洗浄し、そしてジメトキシプロパンと無水アルコールで脱水した。アセトンと Spurr 樹脂の 1:1 混合液の一滴をガラススライド上の各々の切片に滴下し、そして 1 時間後純粋な樹脂の一滴で置き換えた。樹脂を充填したゼラチン包埋カプセルを切片の表面に静置し 4°C で一晩放置した。55°C で 8 時間重合した後、樹脂ブロックに付着した厚い切片は、液体窒素に浸すことによりスライドから分離され得た。

ブロックの形を整え、ミクロトーム上でダイヤモンドナイフを用いて、100 nm の厚さの切片を切断した。切片を酢酸ウラニル水溶液およびクエン酸鉛で染色し

た。切片を電子顕微鏡内で、80kVで検討した。

この検査は光学顕微鏡での観察を確認し、リアーゼを生産する中国の株の G. I amneiformis が菌類の寄生体あるいは共生体に感染しているというさらなる証拠を提供了。

菌類菌糸は、長さ 50-100μl および直径僅か数ミクロンの管状細胞から作られている。この細胞は隣接した細胞の間の隔壁で連続的に整列されている。時折分枝も見られる。菌糸は、壁を貫通したり細胞を損傷したりすることなく藻類葉状体の厚い細胞壁の間に成長する。このような共生関係 (mycophycobiosis と呼ばれる) はいくつかの糸状海洋菌類および大きな海藻間で起こることが知られている (Donk および Bruning, 1992 - 藻類中、および藻類上で水生菌類の生態学。Reisser, W. (編): Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored. Biopress Ltd., Bristol.)

図10の顕微鏡写真を検討すると、藻類細胞および菌類細胞の間のいくつかの違いに気付き得る。藻類の数 μm の厚さの壁と対照的に、菌類の細胞壁は僅か 100~200nm の厚さである。チラコイド膜を有するクロロプラストおよび紅藻デンプン粒子のような植物に典型的なオルガネラが、藻類細胞内には見られ得るが、菌類内には見られない。

紅藻類の細胞間の連結は壁孔プラグ (pit plug) あるいは壁孔連絡と呼ばれる特異的な構造により特徴付けられる。この構造は突起した、電子密核 (electron dense core) であり、それらは藻類分類学において重要な特徴である (Puesche I, C.M.: 紅藻類の壁孔プラグの超構造の拡張した概観。J. Phycol. 25, 625 (1989))。本発明者らの試料では、このような連結は頻繁に藻類葉状体内で観察された。しかし、菌類の細胞の間には全く見られなかった。

A.1.2 インサイチュハイブリダイゼーション実験

インサイチュハイブリダイゼーション技術はアンチセンスリボヌクレオトチド配列の mRNA へのハイブリダイゼーションの原理に基づく。この技術は mRNA が存在する顕微鏡切片中の領域を視覚化するために用いられる。この特定の場合、この技

在化するために用いた。

A.1.2.1 インサイチュハイブリダイゼーションのための³³S 標識したプローブの調製

第3のPCR增幅からの238 bp(クローン2と呼ばれる(前記参照))をpGEM-3Z(+)(Promega)にクローン化した。アンチセンスRNAの転写はSP6プロモーターで駆動し、センスRNAの転写はT7プロモーターで駆動した。Ribonuclease protection assay kit(Ambion)を以下のとおり改変して使用した。転写産物を6%シーケンシングゲルで泳動して、取り込まれていないヌクレオチドを除去し、T7RNA polymerase in vitro Transcription Kit(Ambion)で提供される溶出緩衝液で溶出した。アンチセンス転写産物は23の非コードヌクレオチドを含み、一方センス転写産物は39の非コードヌクレオチドを含んでいた。ハイブリダイゼーションのために 10^7 cpm/mlの³³S 標識したプローブを用いた。

インサイチュハイブリダイゼーションは本質的にLangedaleら(1988)に記載のように実施した。ハイブリダイゼーションの温度は45℃が至適であることが見出された。45℃で洗浄した後、切片をKodak K-5 photographic emulsionで覆い、3日間5℃で暗所に放置した(Langedale, J.A., Rothermel, B.A.およびNelson, T.(1988). Genes and development 2: 106-115. Cold Spring Harbour Laboratoryを参照)。

α -1,4-グルカンリアーゼのmRNAに対するリボプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーション実験は、*Gracilaria* *lemaneiformis*内に検出された菌類の菌糸の上面および周辺に強いハイブリダイゼーションを示した(図4および5参照)。これは α -1,4-グルカンリアーゼが生産されていることを示す強い証拠であると考えられる。弱いランダムなバックグラウンド反応を両方の*Gracilaria* *lemaneiformis*の藻類組織で検出した。この反応は、センスおよびアンチセンス両方のプローブについて観察された。菌類菌糸の上面の強い染色はアンチセンスプローブを用いたときにのみ得られた。

これらの結果はハイブリダイゼーションおよび洗浄の工程における45℃での標

準的なハイブリダイゼーションの条件を用いて得られた。50℃では菌類の上面の

染色は観察されなかつたが、バックグラウンドの染色は同様であった。55℃に温度を上げることにより、センスおよびアンチセンスプローブの両方で、有意にかつ等しくバックグラウンドの染色が減衰した。

相補的染色手順を用いた細胞学的検査に基づき、*Gracilariaopsis lemameiformis*は菌類に感染していることが結論される。感染は、藻類組織の下部において最も顕著である。

切片化した*Gracilariaopsis lemameiformis*試料において、インサイチュハイブリダイゼーションの結果は、ハイブリダイゼーションが菌類の感染が見い出される領域に限定されていることを明確に示す（図4参照）。この結果は α -1,4-グルカンリニアーゼのmRNAが*Gracilariaopsis lemameiformis*の菌類に感染した領域に限定されているように見えることを示す。これらの観察に基づき、本発明者らは菌類に感染した*Gracilariaopsis lemameiformis*内に α -1,4-グルカンリニアーゼ活性が検出されると結論する。

A.2. 酵素の精製と特徴付け

菌類に感染した*Gracilariaopsis lemameiformis*由来の α -1,4-グルカンリニアーゼの精製は以下のように実施した。

A.2.1 材料と方法

藻類は濾過により回収し、0.9% NaClで洗浄した。細胞をホモゲナイゼーションによって破壊し、次いで氷上で6×3分間、50 mMクエン酸-NaOH pH6.2（緩衝液A）中で超音波破碎した。細胞破片(debris)は25,000×g、40分間遠心して取り除いた。この手順で得られた上清を無細胞抽出物とみなし、8～25%の勾配ゲルで分離した後、活性染色およびウエスタンブロッティングに用いた。

A.2.2 β -シクロデキストリン Sepharoseゲルによる分離

無細胞抽出物をあらかじめ緩衝液Aで平衡化した β -シクロデキストリン Sepharoseゲル4Bカラム(2.6×18cm)に直接かけた。このカラムを3倍量の緩衝液Aお

よび1M NaClを含む2倍量の緩衝液Aで洗浄した。 α -1,4-グルカンリニアーゼを緩衝液A中の2%デキストリンを用いて溶出した。活性のある画分をプールし緩衝液を20 mMビストリスプロパン-HCl(pH7.0, 緩衝液B)に変えた。

活性のある画分をあらかじめ緩衝液Bで平衡化したMono Q HR5/5カラムにかけた。菌類のリーゼを0.3M NaClの直線勾配で緩衝液Bを用いて溶出した。

β -シクロデキストリン Sepharoseクロマトグラフィーの後に得られたリーゼ調製物は、あるいは150 μ lに濃縮し、FPLC条件下で操作されたSuperose12カラムにかけた。

A. 2.3 α -1,4-グルカンリーゼ活性のアッセイならびに基質特異性、至適pH、および至適温度決定のための条件

α -1,4-グルカンリーゼ活性のアッセイのための反応混合液は10mg/mlアミロベクチンおよび25mM Mes-NaOH(pH6.0)を含んだ。反応は30°Cで30分間行い、3,5-デニトロサリチル酸試薬を加えて停止した。光学密度は、室温で10分間おいた後に550nmで測定した。

A. 3. 菌類感染 Gracilariopsis lemaneiformis 由来の α -1,4-グルカンリーゼのアミノ酸配列決定

A. 3.1 リーゼのアミノ酸配列決定

リーゼを Clostridium histolyticum 由来のエンドプロティナーゼ Arg-C または Lysobacter enzymogenes 由来のエンドプロティナーゼ Lys-C のいずれかで消化した。いずれも配列決定用グレードであり、Boehringer Mannheim, Germanyから購入した。エンドプロティナーゼ Arg-C での消化のために、凍結乾燥したリーゼ(0.1mg)を50 μ lの10M尿素、50mMメチルアミン、0.1M Tris-HCl、pH7.6に溶解した。N₂で覆い、10 μ lの50mM DTT および 5mM EDTA を添加し、N₂下50°Cで10分間、タンパク質を変性および還元させた。続いて、10 μ lの50mM Tris-HCl、pH8.0中の1 μ gのエンドプロティナーゼ Arg-C を添加し、N₂で覆い、消化を37°Cで6時間行った。次のシステインの誘導体化のために、12.5 μ lの100mMヨードアセトアミドを添加し、N₂下、暗所で室温、15分間インキュベートした。

エンドプロティナーゼ Lys-C での消化のために、凍結乾燥したリーゼ(0.1mg)を50 μ lの8M尿素、0.4M NH₄HCO₃、pH8.4に溶解した。N₂で覆い、5 μ lの45mM DTT を添加した後、N₂下50°Cで15分間、タンパク質を変性および還元させた。室温まで冷却した後、5 μ lの100mMヨードアセトアミドを添加して、N₂下、暗所で室温

、15分間システィンを誘導体化した。

次に、90μlの水および50μlの50mM tricineおよび10mM EDTA、pH8.0中の5μgのエンドプロテイナーゼLys-Cを添加し、消化をN₂下37℃24時間行った。

この結果生じたペプチドを溶媒A(水中の0.1%TFA)および溶媒B(アセトニトリル中の0.1%TFA)を用いて、VYDAC C18カラム(0.46×15cm; 10μm; The Separations Group; California)上の逆相HPLCに分離した。選択したペプチドをパルス化高速液体サイクル(pulsed-liquid fast cycles)を用いてApplied Biosystems 476Aシーケンサーによって配列決定する前に、Develosil C18カラム(0.46×10cm; 3μm; Dr. Ole Schou, Novo Nordisk, Denmark)で再クロマトグラフした。

菌類に感染したGracilariopsis lemaneiformis由来の酵素からのアミノ酸配列情報を以下、特に配列番号1、および配列番号2に示す。

配列番号1は以下を有する：

アミノ酸残基数：1088

アミノ酸組成（シグナル配列を含む）

=====

| | | | | |
|--------|---------|--------|--------|--------|
| 61 Ala | 15 Cys | 19 His | 34 Met | 78 Thr |
| 51 Arg | 42 Gln | 43 Ile | 53 Phe | 24 Trp |
| 88 Asn | 53 Glu | 63 Leu | 51 Pro | 58 Tyr |
| 79 Asp | 100 Gly | 37 Lys | 62 Ser | 77 Val |

配列番号2は以下を有する：

アミノ酸残基数：1091

アミノ酸組成（シグナル配列を含む）

=====

| | | | | |
|--------|---------|--------|--------|--------|
| 58 Ala | 16 Cys | 14 His | 34 Met | 68 Thr |
| 57 Arg | 40 Gln | 44 Ile | 56 Phe | 23 Trp |
| 84 Asn | 47 Glu | 69 Leu | 51 Pro | 61 Tyr |
| 81 Asp | 102 Gly | 50 Lys | 60 Ser | 76 Val |

研究により天然のグルカンリアーゼ1のN-末端配列がブロックされていることが示された。脱ブロック化を本質的に LeGendreら (1993) [タンパク質およびペプチドの SDS-PAGEによる精製; Matsudaira, P. (編) *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*, 第2版; Academic Press Inc., San Diego; pp. 74-101]に記載の方法に従い、PVDF膜にプロットされたグルカンリアーゼ1を無水TFAで40℃で30分間処理することにより達成した。得られた配列は TALSDKQTAであった。これはグルカンリアーゼ1のクローン由来の配列（配列番号1の51位～59位の配列）と一致し、グルカンリアーゼ1のN-末端残基がN-アセチルスレオニンであることを示す。配列番号1の1位～50位の配列はシグナル配列を表す。

A.4. 菌類に感染した *Gracilariaopsis lemaneiformis* 由来の α -1,4-グルカンリアーゼをコードする遺伝子のDNA配列決定

A.4.1 分子生物学のための方法

以下の改変を加えて Saunders (1993) に記載の方法のようにDNAを単離した： ポリサッカライドを、DNAからゲル精製のかわりにELUTIP-d (Schleicher & Schuell) 精製により除去した (Saunders, G.W. (1993). 紅藻類ゲノムDNAのゲル精製: PCRに有用なDNAを単離するための、安価で迅速な方法。 *Journal of phycology* 29(2): 251-254 および Schleicher & Schuell: ELUTIP-d. DNAの精製および濃縮のための迅速な方法。を参照のこと)。

A.4.2 PCR

目的のDNAの調製は、Gene Amp DNA Amplification Kit (Perkin Elmer Cetus, USA)を使用し、Taqポリメラーゼを後に加え (PCRサイクルを参照のこと)、温度サイクルを以下のように変更した以外は製造業者の使用説明書に従い行った：
PCRサイクル：

| サイクル数 | C | 時間(分) |
|--------------------------|----|-------|
| 1 | 98 | 5 |
| | 60 | 5 |
| <i>Taqポリメラーゼ および油の添加</i> | | |
| 35 | 94 | 1 |
| | 47 | 2 |
| | 72 | 3 |
| 1 | 72 | 20 |

A. 4. 3 PCRフラグメントのクローニング

PCRフラグメントは製造業者の使用説明書に従い pT7Blue(Novagen)にクローニングした。

A. 4. 4 DNA配列決定

二本鎖DNAはSangerら(1979)のジデオキシ法に本質的に従い、Auto Read Sequencing Kit(pharmacia)およびPharmacia LKB A.L.F.DNAシーケンサー(参考: Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A.R. (1979). 鎮終結インヒビターを用いたDNA配列の決定 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.)を用いて配列決定を行った。

配列を配列番号1および2として示す。簡潔に記載すると:

配列番号3は以下を有する:

総塩基数: 3267。

DNA配列組成: 850 A; 761 C; 871 G; 785 T

配列番号4は以下を有する:

総塩基数: 3276。

DNA配列組成: 889 A; 702 C; 856 G; 829 T

A. 4. 5 ライブライアリのスクリーニング

Stratageneより得た、Izapライブライアリのスクリーニングを、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを2×SSC, 0.1%SDS, 10×Denhardt'sおよび100 μg/ml変性サケ精子DNA中で行った以外は製造者の使用説明に従って行った。ハイブリダイゼーション溶液に32Pで標識した変性プローブを添加した

。ハイブリダイゼーションは55°Cで1晩行った。フィルターを2×SSC、0.1%SDS中で2回、および1×SSC、0.1%SDS中で2回洗浄した。

A.4.6 プローブ

クローン化したPCRフラグメントを、適切な制限酵素を用いた消化により、pT7 blueベクターから単離した。フラグメントをアガロース電気泳動によってベクターから分離し、フラグメントをAgarase(Boehringer Mannheim)によってアガロースから精製した。フラグメントはわずか90~240bpの長さであったのでPrime-It random primer Kit(Stratagene)またはReady to Go DNA labelling kit(pharmacia)を用いて³²P-dCTPで標識する前にライゲーション反応に暴した。

A.4.7 結果

A.4.7.1 α -1,4-グルカンリアーゼをコードするPCR DNAフラグメントの生成

α -1,4-グルカンリアーゼ由来の、3つの重複するトリプシンペプチドのアミノ酸配列(下に示す)を、混合オリゴヌクレオチドを生成するために用いた。このオリゴヌクレオチドはMCおよびMVの両方から単離したDNAを増幅するためのPCRプライマーとして用いられ得た(前記の配列を参照)。

第1のPCR増幅において、プライマーA/B(前記参照)を上流のプライマーとして、プライマーC(前記参照)を下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは71塩基対である。

第2のPCR増幅において、プライマーA/Bを上流のプライマーとして、プライマーEを下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは161塩基対である。

第3のPCR増幅において、プライマーF1(前記参照)およびプライマーF2(前記参照)を上流のプライマーとして、プライマーEを下流のプライマーとして用いた。予想されるPCR産物の長さは238塩基対である。

このPCR産物を2%LMTアガロースゲルで分析し、予想される長さのフラグメントをゲルから切り出して、Agarase(Boehringer Manheim)で処理し、そしてpT7 blueベクター(Novagen)にクローン化して配列決定した。

第1および第2のPCR増幅由来のクローン化したフラグメントは、配列決定し

たペプチド（前記参照）に相当するアミノ酸をコードしていた。第3の増幅由来のクローン（前記参照）は配列決定したペプチドに対して約87%のみ相同であった。

A.4.7.2 クローン化したPCRフラグメントを用いたゲノムライブラリーのスクリーニング。

前記したクローンを用いたライブラリーのスクリーニングにより2つのクローンを得た。1つのクローンは配列番号4（遺伝子2）のヌクレオチド配列を含有した。他のクローンは配列番号3の配列の一部を含有した（塩基対1065から下流）（遺伝子1）。

配列番号3の5'末端（すなわち塩基対1064から上流）はGibco BRLの5' race systemを用いたRACE (rapid amplification of cDNA ends) 手順 (Michael, A. F., Michael, K.D. および Martin, G.R. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9902) により得た。全RNAをCollingeら (Collinge, D.B., Milligan D.E., Dow, J.M., Scofield, G. および Daniels, M.J. (1987). Plant Mol Biol 8: 405-414) に従い単離した。5' raceは、1 μgの全RNAを用いて、製造業者のプロトコルに従い実施した。第2の増幅由来のPCR産物をNovagenのpT7blue vectorに製造業者のプロトコルに従いクローン化した。PCRエラーを補償するために3つの独立したPCRクローンを塩基配列決定した。

上で記載のクローンにATG開始コドンの直前のXbaIおよびNdeI制限部位を補足するために以下のオリゴヌクレオチドを上流のプライマーに用いて：

GCTCTAGAGCCATGTTTCAACCCTTGCG、そして配列GLI（すなわち配列番号3）の塩基対1573-1593の相補配列を含むプライマーを下流のプライマーとして用いて、追加のPCRを実施した。

遺伝子1の完全な配列（すなわち配列番号3）はStratageneのpBluescript II KS+ベクターに遺伝子の3'末端をゲノムクローン由来のBamHI-HindIIIフラグメントとしてクローン化し、そしてさらにPCRにより生成した遺伝子の5'末端をXbaI-BamHIフラグメントとして3'末端の前にクローン化することにより生成した。

遺伝子 2 を、 HindIII 平滑末端化フラグメントとして Stratagene の pBluescript II KS+ ベクターの EcoRV 部位にクローン化した。 3' 非転写配列の一部を SacI 消化により除去し、次に再結合した。 HindIII および HpaI 制限部位を開始 ATG の直前に、 HindIII および NarI 消化、および以下のアニールしたオリゴヌクレオチドの存在下での再結合により導入した。

AGCTTGTTAACATGTATCCAACCCCTCACCTCGTGG
ACAATTGTACATAGGTTGGGAGTGGAAAGCACCGC

配列決定したクローン内にイントロンを見出さなかった。

クローン 1 タイプ（配列番号 3）を 10 のペプチド配列全てと（図 8 参照） 100% の同一性を示して、並べ得る菌類に感染した *Gracilariaopsis lemaneiformis* から単離された遺伝子によりコードされる二つのタンパク質の配列のアライメントは約 78% の同一性を示した。これは両方の遺伝子が α -1,4-グルカンリニアーゼをコードすることを示す。

A. 5 微生物における GL 遺伝子の発現

（例えば、 *Pichia* のリアーゼ形質転換体および *Aspergillus* のリアーゼ形質転換体の分析）

GL をコードする DNA 配列を微生物に導入し、高い比活性を有する酵素を大量に生産した。

これに関して、遺伝子 1 (すなわち配列番号 3) を *Pichia pastoris* で発現させるために (Invitrogen により供給される Pichia Expression Kit 中に記載のプロトコールに従って) *Pichia* 発現ベクター pHIL-D2 (AOX1 プロモーターを含有する) を EcoRI で消化し平滑末端化 (Amersham International の DNA blunting kit を使用) したものに、 NotI-HindIII 平滑末端化 (Amersham International の DNA blunting kit を使用) フラグメントとしてクローン化した。

別の実施態様では、遺伝子 1 (すなわち配列番号 3) は、 *Aspergillus niger* で発現させるために (Pallら、(1993) Fungal Genet Newslett. vol 40 pages 59-62) 、 *Aspergillus* 発現ベクター pBARMTEI (*Neuropera crassa* 由来のメチルトリプトファン耐性プロモーターを含有する) を SmaI で消化したものに、 NotI-HindIII 平

滑末端化フラグメント(Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用)としてクローン化した。プロトプラストはDaboussiら(Curr Genet(1989)Vol 15 pp453-456)に従って溶解(lysing)酵素Sigma L-2773およびリティカーゼ(lyticase)Sigma L-8012を使用して調製した。プロトプラストの形質転換はBuxtonら(Gene (1985) vol 37 pp207-214)に記載のプロトコルに従ったが、形質転換したプロトプラストのブレーティングに関しては、0.6%の浸透圧安定化トップアガロースを使用した以外はPuntら(Methods in Enzymology (1992) vol 216 pp447-457)により立案されたプロトコールに従った。

結果は、形質転換した*Pichia pastoris*および*Aspergillus niger*においてリアーゼ活性が観察されたことを示した。

A.5.1 一般的な方法

無細胞抽出物の調製

細胞を9000rpm、5分間遠心することによって回収し、0.9%NaClで洗浄し、破碎(breaking)緩衝液(1mM EDTA、および5%グリセロール含有50mM K-リン酸、pH7.5)に再懸濁した。細胞はガラスビーズおよびボルテックス処理を用いて破碎した。破碎緩衝液は1mMのPMSF(プロテアーゼインヒビター)を含有した。リアーゼ抽出物(上清)を、9000rpmで5分間遠心し、次いで20,000×gで5分間遠心後得た。

アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬(DNS)によるリアーゼ活性のアッセイ
リアーゼ抽出物の1倍量を等量の4%アミロベクチン溶液と混合した。反応混合液は制御された温度でインキュベートし、そして試料は特定の間隔で取り出しAFについて分析した。

リアーゼ活性はまた、放射活性方法を使用して分析した。

反応混合液は、10μlの¹⁴C-デンプン溶液(1μCi; Sigma Chemicals Co.)および10μlのリアーゼ抽出物を含有した。反応混合液は25℃で1晩おき、その後通常のTLC系で分析した。生成された放射活性AF産生量はInstant Imager(Packard Instrument Co., Inc., Meriden, CT)を用いて検出した。

電気泳動およびウェスタンブロッティング

SDS-PAGEは8~25%勾配ゲルおよびPhastSystem(Pharmacia)を使用して行った。

ウェスタンプロットティングも PhastSystem の Semidry transfer unit で実施した。

Qingdao(中国)で採取された紅海藻から精製されたリアーゼに対してもたらされた 1 次抗体を 1:100 に希釈して使用した。アルカリホスファターゼ(Dako A/S, Glostrup, Denmark)に結合したブタ抗ウサギ IgG を 2 次抗体として使用し、1:100 に希釈して使用した。

パート 1、前記構築物を含有する Pichia 形質転換体の分析

結果：

1. リアーゼ活性を誘導後 5 日目に測定し(手引き書に従い)、B シリーズの全ての試料について活性が細胞内であることが判明した。

| | | | | | | | | | |
|-------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| B シリーズの試料 : | 11 | 12 | 13 | 15 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 比活性 : | 139 | 81 | 122 | 192 | 151 | 253 | 199 | 198 | 150 |

*比活性は、10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中の 2% (w/v) グリコーゲン、1% (w/v) グリセロールを含有する反応混合液中で mg タンパク質あたり、1 分あたりに放出される nmol AF として定義する。反応温度は 45°C であり；反応時間は 60 分であった。

試料 B27 の経時変化は以下のとおりである。データをまた、図 1 に示す。

| | | | | | | | |
|-------|---|----|----|----|-----|-----|-----|
| 時間(分) | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 比活性 | 0 | 18 | 54 | 90 | 147 | 179 | 253 |

アッセイの条件は時間の変化を除いて上記と同様である。

2. ウエスタンプロット分析

全ての試料の CFE は天然のリアーゼに相当する分子量を有するバンドを示した

*Pichia pastoris*において細胞内で発現されたMC-リアーゼ

| 培養物の名称 | 比活性 |
|--------|-----|
| A18 | 10 |
| A20 | 32 |
| A21 | 8 |
| A22 | 8 |
| A24 | 6 |

パートII、*Aspergillus*形質転換体

結果

I. リアーゼ活性は、5日間のインキュベーション(0.2%カゼイン酵素的加水分解産物を含む最少培地)の後、アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬による分析で測定した。

1) 培養液のリアーゼ活性の分析

0.2%アミロベクチンとともに増殖させた35の培養物の中で、AFは2つの培養物でのみ検出された。5.4+および5.9+の培養物はそれぞれ0.13g AF/リットルおよび0.44g/リットルを含有していた。この結果は活性なリアーゼが細胞から分泌されていることを示した。リアーゼ活性はまた、無細胞抽出物中でもまた測定可能であった。

2) 無細胞抽出物におけるリアーゼ活性の分析

| 培養物の名稱 | 比活性 * |
|--------|-------|
| 5.4+ | 51 |
| 5.9+ | 148 |
| 5.13 | 99 |
| 5.15 | 25 |
| 5.19 | 37 |

* 比活性は25°CにおけるAF産生のnmol/分/mgタンパク質で定義される。+は0.2%アミロペクチンを添加したことを示す。

結果はGLの遺伝子1がA. nigerにおいて細胞内で発現したことを示す。

形質転換したE. coliを用いた実験は(QiagenのQia express vector kitのクローニングベクターpQE30を用いた)、酵素の発現を示し、この酵素は菌類に感染したGracilariaopsis lemaneiformis由来の精製した酵素に対する抗体により認識された。

された。

B. 供給源 = 菌類

B.1. 菌類 Morchella costata 由来の α -1,4-グルカンリニアーゼの酵素精製および特徴付け

B.1.1 材料と方法

菌類 Morchella costata は、アメリカンタイプカルチャコレクション(ATCC)から得た。この菌類はATCCにより推奨される培養培地を使用して25°Cで振とう培養した。菌糸体は濾過により回収し、0.9%NaClで洗浄した。

菌類細胞をホモゲナイゼーションによって破壊し、次いで氷上で6×3分間、50 mMクエン酸-NaOH pH6.2(緩衝液A)中で超音波破碎した。細胞破片(debris)は25,0

00×g、40分間遠心して取り除いた。この手順で得られた上清を無細胞抽出物とみなし、8～25%の勾配ゲルで分離した後、活性染色およびウエスタンプロッティングに用いた。

B. 1. 2 β -シクロデキストリン Sepharose ゲルによる分離

無細胞抽出物をあらかじめ緩衝液Aで平衡化した β -シクロデキストリン Sepharose ゲル4Bカラム(2.6×18cm)に直接かけた。このカラムを3倍量の緩衝液Aおよび1M NaClを含む2倍量の緩衝液Aで洗浄した。 α -1,4-グルカンリニアーゼを緩衝液A中の2%デキストリンを用いて溶出した。活性のある画分をプールし緩衝液を20mMビス-トリスプロパン-HCl(pH7.0, 緩衝液B)に変えた。

活性のある画分をあらかじめ緩衝液Bで平衡化したMono Q HR 5/5カラムにかけた。菌類のリニアーゼを0.3M NaClの直線勾配で緩衝液Bを用いて溶出した。 β -シクロデキストリン Sepharoseクロマトグラフィーの後に得られたリニアーゼ調製物は、あるいは150μlに濃縮し、FPLC条件下で操作されたSuperose12カラムにかけた。

B. 1. 3 α -1,4-グルカンリニアーゼ活性のアッセイならびに基質特異性、至適pH、および至適温度決定のための条件

α -1,4-グルカンリニアーゼ活性のアッセイのための反応混合液は10mg/mlアミロペクチンおよび25mM Mes-NaOH(pH6.0)を含んだ。

反応は30℃で30分間行い、3,5-デニトロサリチル酸試薬を加えて停止した。光学密度は、室温で10分間おいた後に550nmで測定した。無細胞抽出物を使用する場合は、10mM EDTAをアッセイ混合液に加えた。

このアッセイ混合液の基質アミロペクチンは、他の基質で置換し得、反応温度は本文に記載したように変化し得る。

至適pH検討において、反応混合液は40mM緩衝液中の10mg/mlのアミロペクチンあるいはマルトテトラオースを含有する。使用した緩衝液は、グリシン-NaOH(pH2.0～3.5)、HOAc-NaOAc(pH3.5～5.5)、Mes-NaOH(pH5.5～6.7)、Mops-NaOH(pH6.0～8.0)、およびbicine-NaOH(pH7.6～9.0)であった。反応を、30℃で30分間行つた。至適温度検討における反応条件は、すべての実験において緩衝液Mops-NaOH(

pH6.0)を使用したことを除いて、上記と同じである。反応温度は本文に示したようくに変化した。

SDS-PAGE、ネイティブ-PAGEおよび等電点電気泳動を、8~28%の勾配ゲルおよびpH3~9の勾配ゲルをそれぞれ使用して、PhastSystem(Pharmacia Sweden)で行った。電気泳動に統いて、ゲルを、製造業者(Pharmacia)により推奨される手順に従って銀染色で染色した。糖蛋白は、PhastSystemに適用したPASで染色した。活性染色のためには、電気泳動はネイティブな条件下で6℃で行った。

電気泳動に統いて、ゲルを1%可溶性デンプンの存在下で30℃で一晩インキュベートした。菌類のリアーゼの活性バンドは、I₂/KI溶液を用いた染色により出現させた。

B.1.4 結果

B.1.4.1 α -1,4-グルカンリアーゼの精製、分子量および等電点

菌類のリアーゼは、 β -シクロデキストリン Sepharose、デンプンおよびRed Sepharoseを充填したカラムに吸着することが見出された。 β -シクロデキストリン Sepharose4Bゲルおよびデンプンを充填したカラムを、精製目的のために使用した。

この工程で得られたりアーゼ調製物は、菌類のリアーゼより高い分子量を有する少量の混入タンパク質を含んでいた。混入物は、Mono Q HR 5/5でのイオン交換クロマトグラフィー、またはより効率的に Superose 12でのゲルfiltrationにより除去した。

精製した酵素は無色であり、可視光領域に吸光を示さなかった。分子量は、SDS-PAGEで見積もると、110kDaであると測定された。

精製した菌類のリアーゼは、3~9のpH勾配を有するゲルでの等電点電気泳動で測定するとpI 5.4の等電点を示した。ネイティブ電気泳動ゲルでは、この酵素は単一のバンドとして現れた。このバンドは、活性染色で検出したところ、デンプン分解活性を示した。酵素を抽出した培養期間の長さに依存して、ネイティブおよび等電点電気泳動ゲルでのこの酵素は、同一の移動度およびpIで、明瞭なバンドまたはより拡散したバンドを示した。

B.1.4.2 菌類のリーゼが触媒する反応の至適pHおよび至適温度

菌類のリーゼが触媒する反応の至適pHのpH範囲はpH 5およびpH 7の間であることが見出された。

B.1.4.3 基質特異性

精製した菌類のリーゼは、マルトサッカリドをマルトースからマルトヘプタオースへ分解する。しかし、分解速度は変化する。最も高い活性はマルトテトラオース(100%としての活性)、続いてマルトヘサオソース(97%)、マルトヘプタオース(76%)、マルトリオース(56%)で達成され、そして最も低い活性はマルトース(2%)で観察された。

アミロベクチン、アミロースおよびグリコーゲンはまた、菌類のリーゼにより分解された(%は後に測定する)。菌類のリーゼは、エキソリーゼであり、エンドリーゼではなかった。なぜならこの酵素はp-ニトロフェニル α -D-マルトヘプタオースを分解するが、還元末端プロックされたp-ニトロフェニル α -D-マルトヘプタオースを分解できなかったからである。

B.1.5 *Morchella vulgaris*

*Morchella vulgaris*から得られた α -1,4-グルカンリーゼの酵素精製および特徴付けのプロトコルは、*Morchella costata*についての上記と同じであった(結果も同様であった)。

B.2. 菌類由来の α -1,4-グルカンリーゼのアミノ酸配列決定

B.2.1 リーゼのアミノ酸配列決定

リーゼを*Clostridium histolyticum*由来のエンドプロティナーゼArg-Cまたは*Lysobacter enzymogenes*由来のエンドプロティナーゼLys-Cのいずれかで消化した。いずれも配列決定用グレードであり、Boehringer Mannheim, Germanyから購入した。エンドプロティナーゼArg-Cでの消化のために、凍結乾燥したリーゼ(0.1mg)を50 μ lの10M尿素、50mMメチルアミン、0.1M Tris-HCl、pH 7.6に溶解した。N₂で覆い、10 μ lの50mM DTTおよび5mM EDTAを添加し、N₂下50℃で10分間、タンパク質を変性および還元させた。続いて、10 μ lの50mM Tris-HCl、pH 8.0中の1 μ gのエンドプロティナーゼArg-Cを添加し、N₂で覆い、消化を37℃で6時間

行つた。

次のシステインの誘導体化のために、 $12.5\mu l$ の $100mM$ ヨードアセトアミドを添加し、N₂下、暗所で室温、15分間インキュベートした。

エンドプロティナーゼLys-Cでの消化のために、凍結乾燥したリアーゼ($0.1mg$)を $50\mu l$ の $8M$ 尿素、 $0.4M\text{ NH}_4\text{HCO}_3$ 、pH8.4に溶解した。N₂で覆い、 $5\mu l$ の $45mM$ DTTを添加した後、N₂下 50°C で15分間、タンパク質を変性および還元させた。室温まで冷却した後、 $5\mu l$ の $100mM$ ヨードアセトアミドを添加して、N₂下、暗所で室温、15分間システインを誘導体化した。次に、 $90\mu l$ の水および $50\mu l$ の $50mM$ tricineおよび $10mM$ EDTA、pH8.0中の $5\mu g$ のエンドプロティナーゼLys-Cを添加し、消化をN₂下 37°C 24時間行つた。

この結果生じたペプチドを溶媒A(水中の0.1%TFA)および溶媒B(アセトニトリル中の0.1%TFA)を用いて、VYDAC C18カラム($0.46 \times 15\text{cm}$; $10\mu m$; The Separations Group; California)上の逆相HPLCに分離した。選択したペプチドをパルス化高速液体サイクル(pulsed-liquid fast cycles)を用いてApplied Biosystems 47

6Aシーケンサーによって配列決定する前に、Develosil C18カラム($0.46 \times 10\text{cm}$; $3\mu m$; Dr.Ole Schou, Novo Nordisk, Denmark)で再クロマトグラフした。

菌類*Morchella costata*由来の酵素のアミノ酸配列情報を図17に示す。

菌類*Morchella vulgaris*由来の酵素のアミノ酸配列情報を図18に示す。

B.3. 菌類由来の α -1,4-グルカンリーゼをコードする遺伝子のDNA配列決定

B.3.1 分子生物学のための方法

DNAはDellaPorteら(1983-Plant Mol Biol Rep vol 1 pp19-21)に記載のように単離した。

B.3.2 PCR

目的のDNA分子の調製は、Gene Amp DNA Amplification Kit(Perkin Elmer Cetus, USA)を使用し、Taqポリメラーゼを後に加え(PCRサイクルを参照のこと)、温度サイクルを以下のように変更した以外は製造業者の使用説明書に従い行つた：

PCRサイクル：

| サイクル数 | C | 時間(分) |
|-------------------------|----|-------|
| 1 | 98 | 5 |
| | 60 | 5 |
| <i>Tagポリメラーゼおよび油の添加</i> | | |
| 35 | 94 | 1 |
| | 47 | 2 |
| | 72 | 3 |
| 1 | 72 | 20 |

B. 3. 3 PCRフラグメントのクローニング

PCRフラグメントは製造業者の使用説明書に従い pT7Blue(Novagen)にクローニングした。

B. 3. 4 DNA配列決定

二本鎖DNAはSangerら(1979)のジデオキシ法に本質的に従い、Auto Read Sequencing Kit(Pharmacia)およびPharmacia LKB A. L. F. DNAシーケンサー(参考：Sanger, F., Nicklen, S. および Coulson, A. R. (1979). 鎮終結インヒビターを用いたDNA配列の決定 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5497.)を用いて配列決定を行った。

B. 3. 5 ライブライリーのスクリーニング

Stratageneより得た、1Zapライブライリーのスクリーニングを、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを2×SSC、0.1%SDS、10×Denhardt'sおよび100 μg/ml変性サケ精子DNA中で行った以外は製造者の使用説明に従って行った。

ハイブリダイゼーション溶液に32Pで標識した変性プローブを添加した。ハイブリダイゼーションは55°Cで1晩行った。フィルターを2×SSC、0.1%SDS中で2回、および1×SSC、0.1%SDS中で2回洗浄した。

B. 3. 6 プローブ

クローン化したPCRフラグメントを、適切な制限酵素を用いた消化により、pT7blueベクターから単離した。フラグメントをアガロースゲル電気泳動によってベクターから分離し、フラグメントをAgarase(Boehringer Mannheim)によってアガ

ロースから精製した。フラグメントはわずか90~240bpの長さであったのでPrime-It random primer kit(Stratagene)またはReady to Go DNA labelling kit(Pharmacia)を用いて³²P-dCTPで標識する前にライゲーション反応に曝した。

B.3.7 結果

B.3.7.1 α-1,4-グルカンリアーゼをコードするPCR DNAフラグメントの生成

α-1,4-グルカンリアーゼ由来の、3つの重複するトリプシンペプチドのアミノ酸配列（以下に示す）を、混合オリゴヌクレオチドを生成するために用いた。このオリゴヌクレオチドはMCおよびMVの両方から単離したDNAを増幅するためのPCRプライマーとして用いられた。

Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr Val Leu Asp Ile Val Lys
Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly Glu Met Gly Gly Ile Gln Phe Met Lys
Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr
Ala Gln Gly Ala Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr

第1のPCR増幅において、プライマーA1/A2（下記参照）を上流のプライマーとして、プライマーB1/B2（下記参照）を下流のプライマーとして用いた。

プライマー A1: CA(GA)CA(CT)AA(GA)ATGCT(GATC)AA(GA)GA(CT)AC
プライマー A2: CA(GA)CA(CT)AA(GA)ATGTT(GA)AA(GA)GA(CT)AC
プライマー B1: TA(GA)AA(GATC)GG(GA)TC(GA)CT(GA)TG(GA)TA
プライマー B2: TA(GA)AA(GATC)GG(GA)TC(GATC)GA(GA)TG(GA)TA

PCR産物を2%LMTアガロースゲルで分析し、予想される長さのフラグメントをゲルから切り出して、Agarase (Boehringer Manheim)で処理し、そしてpT7blueベクター (Novagen)にクローン化して配列決定した。

PCR増幅由来のクローン化フラグメントは、配列決定したペプチド（上記参照のこと）に対応するアミノ酸をコードしており、またそれぞれの場合でさらに2つのイントロンをコードしていた。MCについては、PCR増幅したDNA配列は、図14を参考にすると、1202位から1522位で示される配列に対応する。MVについては、PCR増幅したDNA配列は、図15を参考にすると1218位から1535位で示される配列に対応する。

B.3.7.2 クローン化したPCRフラグメントを用いたゲノムライブラリーのスクリーニング。

上記のクローンを用いたライブラリーのスクリーニングにより、それぞれの供給源で2つのクローンを得た。MCについては、2つのクローンを組み合わせて図14に示す配列を形成した（下記参照のこと）。MVについては、上に記載の方法により、2つのクローンを組み合わせて図15に示す配列を形成した。

MCクローンにATG開始コドンの直前のPstI、PvuII、AscI、およびNcoI制限部位を補足するために以下のオリゴヌクレオチドを上流のプライマーに用いて：

AAACTGCAGCTGGCGGCCATGGCAGGGATTTCTGAT、そして図4中の塩基対1297-1318の

相補配列を含むプライマーを下流のプライマーとして用いて、追加のPCRを実施した。

MCの完全な配列を、StratageneのpBluescript II KS+ベクターのBamHI-EcoRI部位に、遺伝子の5'末端をゲノムクローンの1つ（クローン1）由来のBglIII-EcoRIフラグメントとしてクローン化することにより生成した。遺伝子の3'末端を、次に、修飾したpBluescript II KS+ベクターをEcoRIおよびEcoRVで消化した後、他のゲノムクローン（第2のクローン）からのNspV（Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用して平滑末端化した）-EcoRIフラグメントと連結することにより、修飾したpBluescript II KS+ベクターにクローン化した。次に、遺伝子の中間部分を、EcoRIで消化したさらに修飾したpBluescript II KS+ベクターに、第1のクローンからのEcoRIフラグメントを連結することにより、さらに修飾したpBluescript II KS+ベクターにクローン化した。

B.4 微生物におけるGL遺伝子の発現

GLをコードするDNA配列を微生物に導入し、高い比活性を有する酵素を大量に生産し得る。

これに関して、MC遺伝子（図14）をPichia pastorisで発現させるために（Invitrogenにより供給されるPichia Expression Kit中に記載のプロトコールに従つて）Pichia発現ベクターpHIL-D2（AOX1プロモーターを含有する）をEcoRIで消化し平滑末端化（Amersham InternationalのDNA blunting kitを使用）したものに、Xb

*al-Xba*I 平滑末端化 (Amersham International の DNA blunting kit を使用) フラグメントとしてクローニングした。

別の実施態様では、MC遺伝子 1 (上記のようにPCRにより修飾して、制限部位を導入する以外は図14と同じである) は、*Aspergillus niger*で発現させるために (Pallら、(1993) Fungal Genet Newslett. vol 40 pages 59-62)、*Aspergillus* 発現ベクター pBARMTE1 (*Neuropera crassa* 由来のメチルトリプトファン耐性プロモーターを含有する) を *Sma*I で消化したものに、*Pvu*II-*Xba*I 平滑末端化フラグメント (Amersham International の DNA blunting kit を使用) としてクローニングした。プロトプラストは Daboussi ら (Curr Genet (1989) Vol 15 pp 453-456) に従つ

て溶解 (lysing) 酵素 Sigma L-2773 およびリティカーゼ (lyticase) Sigma L-8012 を使用して調製した。プロトプラストの形質転換は Buxton ら (Gene (1985) vol 37 p p 207-214) に記載のプロトコルに従ったが、形質転換したプロトプラストのブレーティングに関しては、0.6% の浸透圧安定化トップアガロースを使用した以外は Punt ら (Methods in Enzymology (1992) vol 216 pp 447-457) により立案されたプロトコルに従った。

結果は、形質転換した *Pichia pastoris* および *Aspergillus niger*においてリアーゼ活性が観察されたことを示した。

Pichia リアーゼ形質転換体および *Aspergillus* リアーゼ形質転換体の解析

一般的な方法

無細胞抽出物の調製

細胞は 9000 rpm、5 分間遠心することによって回収し、0.9% NaCl で洗浄し、破碎 (breaking) 緩衝液 (1 mM EDTA、および 5% グリセロール 含有 50 mM K-リン酸、pH 7.5) に再懸濁した。細胞はガラスビーズおよびボルテックス処理を用いて破碎した。破碎緩衝液は 1 mM の PMSF (プロテアーゼインヒビター) を含有した。リアーゼ抽出物 (上清) を、9000 rpm で 5 分間遠心し、次いで 20,000 × g で 5 分間遠心後得た。

アルカリ性 3,5-ジニトロサリチル酸試薬 (DNS) によるリアーゼ活性のアッセイ

リアーゼ抽出物の 1 倍量を等量の 4% アミロベクチン溶液と混合した。反応混合液は制御された温度でインキュベートし、そして試料は特定の間隔で取り出し AF

について分析した。

リアーゼ活性はまた、放射活性方法を使用して分析した。

反応混合液は、 $10\mu\text{l}$ の ^{14}C -デンプン溶液($1\mu\text{Ci}$; Sigma Chemicals Co.)および $10\mu\text{l}$ のリアーゼ抽出物を含有した。反応混合液は 25°C で1晩おき、その後通常のTLC系で分析した。生成された放射活性AF産生量はInstant Imager(Packard Instrument Co., Inc., Meriden, CT)を用いて検出した。

電気泳動およびウェスタンプロットティング

SDS-PAGEは8~25%勾配ゲルおよびPhastSystem(Pharmacia)を使用して行った。

ウェスタンプロットティングもPhastSystemのSemidry transfer unitで実施した。

Qingdao(China)で採取された紅海藻から精製されたリアーゼに対してもたらされた1次抗体を $1:100$ に希釈して使用した。アルカリホスファターゼ(Dako A/S, Glostrup, Denmark)に結合したブタ抗ウサギIgGを2次抗体として使用し、 $1:1000$ に希釈して使用した。

パートI、前記構築物を含有するPichia形質転換体の分析

Pichia pastoris における細胞内で発現されるリアーゼ

| 培養物の名称 | 比活性 * |
|--------|-------|
| A18 | 10 |
| A20 | 32 |
| A21 | 8 |
| A22 | 8 |
| A24 | 6 |

* 比活性は25°Cで1mg蛋白質あたり1分あたりに生成されるAFのnmol数として定義された。

パートII、Aspergillus形質転換体

結果

I. リアーゼ活性は、5日間のインキュベーション(0.2%カゼイン酵素的加水分解産物を含む最少培地)の後、アルカリ性3,5-ジニトロサリチル酸試薬による分析で測定した。

無細胞抽出物中のリアーゼ活性の分析

| 培養物の名称 | 比活性* |
|--------|------|
| 8.13 | 11 |
| 8.16 | 538 |
| 8.19 | 37 |

*比活性は25°Cで1mg蛋白質あたり1分あたりに生成されるAFのnmol数として定義された。

結果はMCリアーゼがA. nigerにおいて細胞内で発現したことを示す。

II. 放射活性方法によるリアーゼ活性の試験

以下の培養物の無細胞抽出物が、¹⁴C標識したAFを含有した。

51+、54+、55+、59+、512、513、514、515、516、518、519。

基質として¹⁴Cデンプンを使用したα-1,4-グルカンリアーゼ反応の分解産物のTLCを、図20に示す。反応混合物をTLCにのせた。レーン番号は培養物の名称に対応する：1,512；2,513；3,514；4,515；5,516；6,517；7,518；8,519；9,520。早く移動した点がAFである。

C. 供給源 = 藻類単独

Gracilariposis lemameifomis (Santa Cruzで得られた) から得られたα-1,4-グルカンリアーゼの酵素精製および特徴付けのプロトコルは、本質的には前記のプロトコル、例えばMorchella Costataと同じである（結果も同様）。

1. カリフォルニアで収集した寄生体のない紅海草であるGracilariposis lemameifomis由来のα-1,4-グルカンリアーゼの特徴付け
リアーゼのアミノ酸組成を以下の表に示す。

| アミノ酸残基 | それぞれの残基のモル% |
|--------|-------------|
| Asx | 15.42 |
| Thr | 5.24 |
| Ser | 6.85 |
| Glx | 9.46 |
| Pro | 5.46 |
| Gly | 9.08 |
| Ala | 5.38 |
| 1/2Cys | 1.57 |
| Val | 6.60 |
| Met | 2.90 |
| Ile | 3.66 |
| Leu | 6.00 |
| Tyr | 6.00 |
| Phe | 4.37 |
| His | 1.65 |
| Lys | 4.44 |
| Arg | 4.17 |
| Trp | 1.75 |
| 総合 : | 100.00 |

| アミノ酸残基 | それぞれの残基のモル% |
|--------|-------------|
| Asx | 15.42 |
| Thr | 5.24 |
| Ser | 6.85 |
| Glx | 9.46 |
| Pro | 5.46 |
| Gly | 9.08 |
| Ala | 5.38 |
| 1/2Cys | 1.57 |
| Val | 6.60 |
| Met | 2.90 |
| Ile | 3.66 |
| Leu | 6.00 |
| Tyr | 6.00 |
| Phe | 4.37 |
| His | 1.65 |
| Lys | 4.44 |
| Arg | 4.17 |
| Trp | 1.75 |
| 総合 : | 100.00 |

2. 配列解析

カリフォルニアの藻類のペプチド配列の、中国の菌類感染藻類のアミノ酸配列との比較は、2つのタンパク質配列の間の高い相同意性（PCRフラグメントで生成したフラグメントのアミノ酸配列と、中国の藻類から得られたGLの対応する配列の間で78~80%同一）を示した。

3つのオリゴヌクレオチドを、カリフォルニアの藻類由来のこれら2つの配列

から作成して、約970bpのPCRフラグメントを生成した。

プライマー 1: ATGAC(GATC)AA(CT)TA(CT)AA(CT)TA(CT)GA(CT)AA

プライマー 2: (AG)TG(GATC)GGCATCAT(GATC)GC(GATC)GG(GATC)AC

プライマー 3: GTCAT(GA)TC(CT)TGCCA(GATC)AC(GA)AA(GA)TC

第 1 の PCR 増幅において、プライマー 1 を上流のプライマーとして使用し、プライマー 2 を下流のプライマーとして使用した。第 2 の PCR 増幅において、プライマー 1 を上流のプライマーとして使用し、プライマー 3 を下流のプライマーとして使用した。期待されたサイズの PCR フラグメントが生成され、Novagen の pT7b Blueベクターにクローン化された。PCR フラグメントを含む 3 つの独立したプラスミドを配列決定し、これらの 3 つのクローン化された PCR フラグメントが、3 つの異なるタンパク質に由来するペプチド配列のコドンを含むことが見出された。このことは、カリフォルニアの藻類には、少なくとも 3 つの異なる α -1,4-グルカンリニアーゼをコードする遺伝子が存在することを示す。

3. 最大速度の半分に達するときの基質濃度は、アミロベクチンで 3.76mg/ml およびグリコーゲンで 3.37mg/ml である。

4. 種々の基質でのリアーゼの分解速度を以下に示す。

| 基質 | 放出AF(nmol) |
|-----------|------------|
| マルトース | 657 |
| マルトトリオース | 654 |
| マルトテトラオース | 670 |
| マルトペンタオース | 674 |
| マルトヘキサオース | 826 |
| マルトヘプタオース | 865 |
| デキストリン 20 | 775 |
| デキストリン 15 | 775 |
| デキストリン 10 | 844 |
| アミロペクチン | 732 |
| グリコーゲン | 592 |

反応条件：反応混合液は、10mMのHOAc-NaOAc(pH3.8)を含有していた。基質濃度は10mg/mlであった。リアーゼおよび水を加えた後の最終容量は100μlであった。反応時間は45℃で40分であった。

リアーゼはブルラン、ニゲランテトラサッカリド、トレハロース、イソマルトース、グルコース、 α -、 β -および γ -シクロデキストリンを分解し得なかった。リアーゼは、低速度でバノースおよびニゲロースを分解した。

5. リアーゼの至適温度は、アミロペクチンを基質とした時48℃であり、グリコーゲンを基質とした時50℃であった。50℃では、グリコーゲンの反応はアミロペクチンの反応と似ていた；50℃以下では、アミロペクチンはグリコーゲンよりも優れた基質であった。

6. リアーゼの至適pH範囲は、pH3.5およびpH7.0の間であった；至適pHは3.8であった。pH試験に用いた緩衝液は、グリシン-HCl(pH2.2～3.6)；NaOAc-HOAc(pH3.5～5.5)；Mes-NaOH(pH5.5～6.7)；Mops-NaOH(pH6.0～8.0)、およびbicine-NaOH(pH7.6～9.0)であった。すべての緩衝液は40mMであった。

7. 2 mMの最終濃度で、p-クロロ安息香酸第二水銀(PCMB)は、リアーゼ活性を96%阻害し、酵素活性に-SH基が必須であることを示す。

7. さらなる研究

7.1 菌類感染藻類から精製したリアーゼの活性および安定性の増加に及ぼすアルコールの影響

1-プロパノール、2-プロパノールおよび1-ブタノールを以下の濃度で試験した(0%、1%、5%、および10%)。1-プロパノールの至適濃度は5%であり、この濃度は6日間インキュベーション後のAF収量を34%増加した；2-プロパノールの至適濃度は1%であり、この濃度は10日間インキュベーション後のAF収量を20%増加した；1-ブタノールの至適濃度は5%であり、この濃度は3日間インキュベーション後のAF収量はを52%増加した。

エタノールを以下の濃度で試験した(0、1、3、5、7、9、11、13、15%)。7日間インキュベーションの至適濃度は5%であり、この濃度はAF収量を12%増加した。10日間インキュベーションの至適濃度は3%であり、この濃度はAF収量を1

6%増加した。

1-プロパノールの影響：

| 1-アロバシル 濃度 (v/v) | 反応時間(日) | | | | |
|------------------------|---------|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| AF 収量(μmol) | | | | | |
| 0% | 0 | 84 | 261 | 451 | 689 |
| 1% | 0 | 80 | 280 | 530 | 803 |
| 5% | 0 | 115 | 367 | 605 | 853 |
| 10% | 0 | 107 | 307 | 456 | 583 |

7.2 菌類感染藻類ならびに *M. costata* および *M. vulgaris* から精製したリアーゼによる AF の生成への異なった反応媒体の影響

2.1. 菌類感染藻類由来のリアーゼ

結果（下の表を参照のこと）は、最も良好な反応媒体は mM 濃度の Na₂-EDTA を含有する 5 mM の HOAc-NaOAc (pH 3.9) (短縮して BACE) であることを示す。純水または 0.85% NaCl のいずれかを反応媒体として使用しての AF の生成は、収量を減少した。BACE 中に 0.85% NaCl を含有すると、AF の収量はまた減少した。

| 反応 媒体 | 反応時間(日) | | | |
|-------------------|---------|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 3 | 8 |
| AF 収量(μmol) | | | | |
| BACE | 0 | 229 | 498 | 575 |
| 水 | 0 | 46 | 128 | 217 |
| NaCl (0.85%) | 0 | 123 | 239 | 249 |
| BACE+NaCl (0.85%) | 0 | 153 | 281 | 303 |

2.2. 以下の緩衝液 : Mes-NaOH、Mops-NaOH、Hepes-NaOH および Bicine-NaOH は、*M. costata* および *M. vulgaris* 由来のリアーゼのための至適反応媒体であった。HOAc-NaOAc 緩衝液中では、リアーゼは不安定であり、それゆえこの緩衝系の使用は、AF 収量の減少を引き起こした。

7.3. エンドアミラーゼおよび脱分枝酵素が AF 生成に及ぼす影響

3.1. エンドアミラーゼの影響

AF 生成に使用されるデンプンは、まずエンドアミラーゼまたは酸加水分解のい

すれかで液状化され得る。

エンドアミラーゼで分解されたデンプンは、もとのデンプンに比較してリアーゼのためのより適切な基質である。デンプンは、リアーゼ反応に使用する温度では、制限された溶解性を有する。デンプンをエンドアミラーゼで処理することにより、グルコース収量が増加に導かれた。10~15%付近（乾燥物質に基づいて）まで変換した物質（reducing matter）が、AFの収量という点からリアーゼのための基質として最も適しており、さらに19%の変換した物質までエンドアミラーゼを用いて処理することは、もはやこのリアーゼには適切ではないことが見出された。

3.2. ブルラナーゼおよびイソアミラーゼの影響

下記の結果に見られるように、イソアミラーゼおよびブルラナーゼの両方は、AFの収量をpH4.5および5.0で50%まで増加させた。反応系は、イソアミラーゼまたはブルラナーゼ（Megazyme Ltd.）を添加してまたは添加しないで、菌類に冒された紅藻類由来のリアーゼからなっていた。アミロベクチンを基質として使用した。リアーゼのみの存在下で生成されたAFを、100%として表した。

| 反応媒体のpH | | | |
|----------------|-----|-----|-----|
| 添加した酵素 | 3.5 | 4.5 | 5.0 |
| リアーゼのみ | 100 | 100 | 100 |
| リアーゼ + イソアミラーゼ | 136 | 152 | 150 |
| リアーゼ + ブルラナーゼ | 132 | 158 | 155 |

4. 種々の基質に対する菌類のリアーゼの相対的分解速度

4.1. *M. costata*由来のリアーゼ

マルトテトラオースで観察された活性を100%として表した。

| 基質濃度 | 2mg/ml | 4mg/ml | 10mg/ml |
|-----------|--------|--------|---------|
| マルトース | 0.5 | 1.6 | 2.2 |
| マルトトリオース | 40.6 | 58.6 | 56.0 |
| マルトテトラオース | 100 | 100 | 100 |
| マルトペンタオース | 107.1 | 100.1 | 99.7 |
| マルトヘキサオース | 86.6 | 98.2 | 95.9 |
| マルトヘプタオース | 82.2 | 81.5 | 75.7 |
| デキストリン10* | -** | - | 68.3 |
| デキストリン15* | - | - | 61.1 |
| デキストリン20* | - | - | 46.6 |
| 可溶性デンプン | - | - | 92.9 |
| アミロペクチン | - | - | 106.5 |
| グリコーゲン | - | - | 128.5 |

*数字は乾燥重量に基づいた変換した物質の含有量を示す。**、測定せず。

4.2. *M. vulgaris*由来のリアーゼ

マルトテトラオースで観察された活性を100%として処理した。すべての基質の最終濃度は10mg/mlであった。

| 基質 | 活性(%) |
|-----------|-------|
| マルトース | 10.1 |
| マルトトリオース | 49.8 |
| マルトテトラオース | 100.0 |
| マルトペンタオース | 79.3 |
| マルトヘキサオース | 92.4 |
| マルトヘプタオース | 73.9 |
| デキストリン 10 | 62 |
| デキストリン 15 | 45 |
| デキストリン 20 | 37 |
| 可溶性デンプン | 100.5 |
| アミロペクチン | 139.9 |
| グリコーゲン | 183.3 |

M. costata および M. vulgaris 由来のリアーゼは以下の糖を分解し得なかった。

トレハロース、バノース、ニゲロース、ニゲロテトラオース、グルコース、イソマルトース、 α -、 β -および γ -シクロデキストリン、ブルラナン (pullulan)
n) ならびに非還元末端のブロックされた p-ニトロフェニル α -D-マルトヘプタ

オシド。なぜならこれらの基質を菌類のリアーゼとともに48時間インキュベートした後、TLCプレート上で検出可能なAFが存在しなかったからである。

7.5. リアーゼ触媒反応の至適pHおよび至適温度

| GL供給源 | 至適pH | 至適pH範囲 | 至適温度 |
|---|------|---------|-------------------------|
| <i>M. costata</i> | 6.5 | 5.5-7.5 | 37 C; 40 C ^a |
| <i>M. vulgaris</i> | 6.4 | 5.9-7.6 | 43 C; 48 C ^a |
| 菌類感染 <i>Gracilarlopsis lemaneiformis</i> | | | |
| | 3.8 | 3.7-4.1 | 40 C; 45 C ^a |

^aグリコーゲンを基質として使用して測定したパラメーター；他のパラメーターはアミロペクチンを基質として使用して測定した。

7.6. 菌類感染 *Gracilarlopsis lemaneiformis* 由来のリアーゼに及ぼすグリコーゲンの安定化効果

結果は、アミロペクチンの代わりにグリコーゲンを使用した場合、より高い温度において反応速度がより高くなることを示す。

| 基質 | 反応温度 | | |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 25 C | 30 C | 45 C |
| アミロペクチン | 0.818 ^a | 1.133 ^a | 1.171 ^a |
| グリコーゲン | 0.592 ^a | 0.904 ^a | 1.861 ^a |
| グリコーゲンおよびアミロペクチンの間の相対的反応速度の比率(%) | 72.4 | 79.8 | 158.9 |

^a、相対的反応速度

7.7. リアーゼの分子量およびpI値

菌類感染 *G. lemaneiformis* 由来のリアーゼ、見かけ上菌類のない *G. lemaneiformis* 由来、*M. costata* および *M. vulgaris* 由来の両方の形態のリアーゼの分子量を、

勾配ゲル(8~25%)でのSDS-PAGEを使用して、110,000±10,000ダルトンと見積もった。

菌類感染*G. lemameiformis*由来のリアーゼのpIは、3.9付近であった。*M. vulgaris*由来のリアーゼについては、pIはpH4.6付近であり、*M. costata*由来のリアーゼについてのpIは5.0付近であった。これらの値は、3から9のpH勾配を有するゲルでの等電点電気泳動によって得られた。

アミノ酸組成から推定されるpI値は以下のとおりである：

菌類感染*G. lemameiformis*由来のリアーゼ：4.58、および*M. costata*由来のリアーゼ：6.30。

7.8. ウエスタンブロッティングによるリアーゼの免疫学的試験。

結果は、藻類のリアーゼに対する抗体が、無細胞抽出物中および精製された形状の両方で、菌類のリアーゼを認識し得ることを示した。これはウエスタンブロッティングにより明らかとなった。中国で収集された藻類から精製された藻類のリアーゼに対する抗体は、カリフォルニアのSanta Cruzから収集された藻類のリアーゼも認識した。

GL供給源

菌類感染*G. lemameiformis*由来の GLに対する抗体の反応性

菌類感染G. lemameiformis

強い

カリフォルニア由来の*G. lemameiformis*

強い

両方の形態

M. costata

中程度

M. vulgaris

中程度

7.9. 菌類のリアーゼの可逆的および非可逆的インヒビター

9.1. 可逆的インヒビター、グルコースおよびマルトース

10mg/mlの基質濃度において、*M. costata*のリアーゼについての活性は、アミロ

ペクチンを基質として使用した場合、0.1Mグルコースの存在下で19.3%減少した；基質としてグリコーゲンを用いた場合、活性は影響されなかった。0.1Mマルトースの存在下では、グリコーゲンおよびアミロペクチンについてそれぞれ48.8%および73.4%活性が減少した。

| 基質濃度 | インヒビター | |
|---------------|-----------|--------------|
| | グルコース | マルトース |
| アミロペクチン1%(2%) | 19.3%(7%) | 73.4%(67.2%) |
| グリコーゲン1%(2%) | 0.000(-) | 48.8%(49.7%) |

0.1Mグルコースによる阻害は、基質を1%から2%に増加させると阻害が19.3から7%に減少するため、拮抗的であるようだが、一方0.1Mマルトースによる阻害は、基質の増加が阻害程度に有意には影響しないため、非拮抗的である。

*M. vulgaris*のリアーゼについては、0.1Mグルコースおよびマルトースは、アミロペクチンまたはグリコーゲンを基質として使用した場合、反応を阻害しなかった。

| 基質 | グルコース | マルトース |
|-------------|-------|-------|
| アミロペクチン(1%) | 28% | 80% |
| グリコーゲン(1%) | 5% | 57% |

9.2. 可逆的インヒビター、デオキシシリミシン

最終基質濃度2%において、活性は、アミロペクチンを基質として用いて、25μMのデオキシシリミシンの存在下で、藻類のリアーゼおよび*M. costata*のリアーゼについて10.4%に減少した。100μMでは、どちらのリアーゼの活性も完全に失われた。

9.3. 非可逆的インヒビター：PCMB

同じアッセイ条件下で、2 mMのPCMBの存在下で、活性は *M. costata* のリアーゼについては 60%、および菌類感染紅藻類由来のリアーゼについては 98% 減少した。このことは、菌類のリアーゼは重金属阻害に対する感受性がずっと少ないということを意味する。

7.10. AFの研究室規模の生成実施例

10.1. デキストリンを基質として使用したAFの生成

反応器は、4.6リットルの最終容量 (HOAc-NaOAc, pH 3.9, 5 mM Na2-EDTA を含有する) 中に、1000gのデキストリン (デンプンを Termamyl で 10% の最終変換物質まで処理して得た) を含んだ。反応は、菌類感染藻類から精製した 3 mg のリアーゼを添加することにより開始した。反応を室温で行った。19日目に、リアーゼの別のバッチ (4 mg) を添加した。

| 反応時間 (日) | | | | | | |
|--------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 7 | 13 | 19 | 24 | 31 |
| <hr/> | | | | | | |
| 生成したAF (グラム) | | | | | | |
| 0 | 18 | 116 | 195 | 264 | 500 | 668 |

10.2. ¹⁴C-AFの生成のための ¹⁴C-デンプンの使用

均一に標識した ¹⁴C-デンプン (Sigma から得た 340 μCi) を、含有していたエタノールを除くために真空乾燥し、次に 2 ml の水に溶解した。反応は、菌類感染藻類から精製した 20 μl のリアーゼおよび 20 μl のブルラナーゼ (Megazyme Ltd.) を添加することにより開始した。反応は 30°C で一晩行った。反応終了時に、反応混合液を 10,000 の分子量カットオフを有するフィルターを使用して濾過して、酵素および未反応のデンプン分子を除去した。

濾液を Waters HPLC を使用して C₁₈ カーボハイドレートカラム (Chrompack) にのせた。水を溶離剤として使用した。流速は 0.5 ml/分であった。AF は、効率的にグルコースおよびマルトサッカリドから分離された。ブールした AF 画分を凍結乾燥して、合計 140 μCi の ¹⁴C-AF を得た。

これらの知見は、本発明のさらなる局面に関連する。すなわち、反応媒体（好ましくはアルコール）の疎水性を増加させて、本発明のリアーゼの安定性および活性を増加し得る試薬の使用である。この安定性の増加は、AF収量を増加へ導く。

本発明の他の修飾は、発明の範囲から逸脱することなく、当業者に明らかである。

配列表

(1)一般の情報:

- (i)出願人:
 (A)名称:ダニスコ エー／エス
 (B)番地:ランゲプロガード 1
 (C)市:コペンハーゲン
 (D)州:コペンハーゲン ケ
 (E)国:デンマーク
 (F)郵便番号:DK-1001
- (ii)発明の名称:1,5-D-アンヒドロフルクトース調製のための α -1,4-グルカンリーゼの使用
- (iii)配列数:39
- (iv)コンピューター読み出し形態:
 (A)媒体型:フロッピーディスク
 (B)コンピューター:IBM PC互換用
 (C)OS:PC-DOS/MS-DOS
 (D)ソフトウェア:パテントイン リリース #1.0, バージョン #1.25(EPO)
- (v)現在の出願データ:
 出願番号:WO PCT/EP94/03397

(2)配列番号1の情報:

- (i)配列の特色:
 (A)長さ:1088アミノ酸
 (B)型:アミノ酸
 (D)トポロジー:直鎖状
- (ii)配列の種類:タンパク質
- (xi)配列:配列番号1:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Phe | Ser | Thr | Leu | Ala | Phe | Val | Ala | Pro | Ser | Ala | Leu | Gly | Ala | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| Thr | Phe | Val | Gly | Ala | Glu | Val | Arg | Ser | Asn | Val | Arg | Ile | His | Ser | Ala |
| | | | | 20 | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Phe | Pro | Ala | Val | His | Thr | Ala | Thr | Arg | Lys | Thr | Asn | Arg | Leu | Asn | Val |
| | 35 | | | | 40 | | | | 45 | | | | | | |
| Ser | Met | Thr | Ala | Leu | Ser | Asp | Lys | Gln | Thr | Ala | Thr | Ala | Gly | Ser | Thr |
| | 50 | | | | 55 | | | 60 | | | | | | | |
| Asp | Asn | Pro | Asp | Gly | Ile | Asp | Tyr | Lys | Thr | Tyr | Asp | Tyr | Val | Gly | Val |
| | 65 | | | | 70 | | | 75 | | | | | 80 | | |
| Trp | Gly | Phe | Ser | Pro | Leu | Ser | Asn | Thr | Asn | Trp | Phe | Ala | Ala | Gly | Ser |
| | | | | | 85 | | | 90 | | | | | 95 | | |

Ser Thr Pro Gly Gly Ile Thr Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val Asn
 100 105 110
 Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Ile Thr Val Gln His Pro Val Gln
 115 120 125
 Val Gln Val Thr Ser Tyr Asn Asn Asn Ser Tyr Arg Val Arg Phe Asn
 130 135 140
 Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Thr Arg Gly Pro Ile Leu Lys Gln
 145 150 155 160
 Gln Leu Asp Trp Ile Arg Thr Gln Glu Leu Ser Glu Gly Cys Asp Pro
 165 170 175
 Gly Met Thr Phe Thr Ser Glu Gly Phe Leu Thr Phe Glu Thr Lys Asp
 180 185 190
 Leu Ser Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg Lys
 195 200 205
 Ser Asp Gly Lys Val Ile Met Glu Asn Asp Glu Val Gly Thr Ala Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr Gly
 225 230 235 240
 Asn Ala Ile Ala Ser Val Asn Lys Asn Phe Arg Asn Asp Ala Val Lys
 245 250 255
 Gln Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Lys Tyr Gln Asp
 260 265 270
 Thr Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr
 275 280 285
 Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro His His Asp
 290 295 300
 Gly Ala Leu Asn Pro Asp Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr Tyr Ala Ala Pro
 305 310 315 320
 Trp Leu Ile Val Asn Gly Cys Ala Gly Thr Ser Glu Gln Tyr Ser Tyr
 325 330 335
 Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Met Asn Thr Gly Asp
 340 345 350
 Thr Thr Trp Asn Ser Gly Gln Glu Asp Leu Ala Tyr Met Gly Ala Gln
 355 360 365
 Tyr Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Gly Ala Gly Gly Met
 370 375 380
 Glu Cys Val Val Thr Ala Phe Ser Leu Leu Gln Gly Lys Glu Phe Glu
 385 390 395 400

Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ser Val Met Pro Pro Lys Tyr Val Phe
 405 410 415
 Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Thr Ser Ser Leu Leu Arg Ala His
 420 425 430
 Met Pro Ala Gly Glu Asn Asn Ile Ser Val Glu Glu Ile Val Glu Gly
 435 440 445
 Tyr Gln Asn Asn Asn Phe Pro Phe Glu Gly Leu Ala Val Asp Val Asp
 450 455 460
 Met Gln Asp Asn Leu Arg Val Phe Thr Thr Lys Gly Glu Phe Trp Thr
 465 470 475 480
 Ala Asn Arg Val Gly Thr Gly Asp Pro Asn Asn Arg Ser Val Phe
 485 490 495
 Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys Gln Thr Asn Ile Thr Cys
 500 505 510
 Phe Leu Arg Asn Asp Asn Glu Gly Gln Asp Tyr Glu Val Asn Gln Thr
 515 520 525
 Leu Arg Glu Arg Gln Leu Tyr Thr Lys Asn Asp Ser Leu Thr Gly Thr
 530 535 540
 Asp Phe Gly Met Thr Asp Asp Gly Pro Ser Asp Ala Tyr Ile Gly His
 545 550 555 560
 Leu Asp Tyr Gly Gly Val Glu Cys Asp Ala Leu Phe Pro Asp Trp
 565 570 575
 Gly Arg Pro Asp Val Ala Glu Trp Trp Gly Asn Asn Tyr Lys Leu
 580 585 590
 Phe Ser Ile Gly Ieu Asp Phe Val Trp Gln Asp Met Thr Val Pro Ala
 595 600 605
 Met Met Pro His Lys Ile Gly Asp Asp Ile Asn Val Lys Pro Asp Gly
 610 615 620
 Asn Trp Pro Asn Ala Asp Asp Pro Ser Asn Gly Gln Tyr Asn Trp Lys
 625 630 635 640
 Thr Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp Met Arg Tyr Glu Asn His
 645 650 655
 Gly Arg Glu Pro Met Val Thr Gln Arg Asn Ile His Ala Tyr Thr Leu
 660 665 670
 Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val Glu Asn Ala Asp Thr Leu
 675 680 685
 Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser Arg Gly Gly Tyr Ile Gly
 690 695 700

Asn Gln His Phe Gly Gly Met Trp Val Gly Asp Asn Ser Thr Thr Ser
 705 710 715 720
 Asn Tyr Ile Gln Met Met Ile Ala Asn Asn Ile Asn Met Asn Met Ser
 725 730 735
 Cys Leu Pro Leu Val Gly Ser Asp Ile Gly Gly Phe Thr Ser Tyr Asp
 740 745 750
 Asn Glu Asn Gln Arg Thr Pro Cys Thr Gly Asp Leu Met Val Arg Tyr
 755 760 765
 Val Gln Ala Gly Cys Leu Leu Pro Trp Phe Arg Asn His Tyr Asp Arg
 770 775 780
 Trp Ile Glu Ser Lys Asp His Gly Lys Asp Tyr Gln Glu Leu Tyr Met
 785 790 795 800
 Tyr Pro Asn Glu Met Asp Thr Leu Arg Lys Phe Val Glu Phe Arg Tyr
 805 810 815
 Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala Phe
 820 825 830
 Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn
 835 840 845
 Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp Gly
 850 855 860
 Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu Arg
 865 870 875 880
 Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro Asp
 885 890 895
 Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala Met Asn Gly Gly Asp Arg Ile
 900 905 910
 Tyr Asn Tyr Pro Val Pro Gln Ser Glu Ser Pro Ile Phe Val Arg Glu
 915 920 925
 Gly Ala Ile Leu Pro Thr Arg Tyr Thr Leu Asn Gly Glu Asn Lys Ser
 930 935 940
 Leu Asn Thr Tyr Thr Asp Glu Asp Pro Leu Val Phe Glu Val Phe Pro
 945 950 955 960
 Leu Gly Asn Asn Arg Ala Asp Gly Met Cys Tyr Leu Asp Asp Gly Gly
 965 970 975
 Val Thr Thr Asn Ala Glu Asp Asn Gly Lys Phe Ser Val Val Lys Val
 980 985 990
 Ala Ala Glu Gln Asp Gly Gly Thr Glu Thr Ile Thr Phe Thr Asn Asp
 995 1000 1005

Cys Tyr Glu Tyr Val Phe Gly Gly Pro Phe Tyr Val Arg Val Arg Gly
 1010 1015 1020

Ala Gln Ser Pro Ser Asn Ile His Val Ser Ser Gly Ala Gly Ser Gln
 1025 1030 1035 1040

Asp Met Lys Val Ser Ser Ala Thr Ser Arg Ala Ala Leu Phe Asn Asp
 1045 1050 1055

Gly Glu Asn Gly Asp Phe Trp Val Asp Gln Glu Thr Asp Ser Leu Trp
 1060 1065 1070

Leu Lys Leu Pro Asn Val Val Leu Pro Asp Ala Val Ile Thr Ile Thr
 1075 1080 1085

(2)配列番号2の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 1091アミノ酸
- (B)型 : アミノ酸
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : タンパク質

(xi)配列 : 配列番号2 :

Met Tyr Pro Thr Leu Thr Phe Val Ala Pro Ser Ala Leu Gly Ala Arg
 1 5 10 15

Thr Phe Thr Cys Val Gly Ile Phe Arg Ser His Ile Leu Ile His Ser
 20 25 30

Val Val Pro Ala Val Arg Leu Ala Val Arg Lys Ser Asn Arg Leu Asn
 35 40 45

Val Ser Met Ser Ala Leu Phe Asp Lys Pro Thr Ala Val Thr Gly Gly
 50 55 60

Lys Asp Asn Pro Asp Asn Ile Asn Tyr Thr Tyr Asp Tyr Val Pro
 65 70 75 80

Val Trp Arg Phe Asp Pro Leu Ser Asn Thr Asn Trp Phe Ala Ala Gly
 85 90 95

Ser Ser Thr Pro Gly Asp Ile Asp Asp Trp Thr Ala Thr Met Asn Val
 100 105 110

Asn Phe Asp Arg Ile Asp Asn Pro Ser Phe Thr Leu Glu Lys Pro Val
 115 120 125

Gln Val Gln Val Thr Ser Tyr Lys Asn Asn Cys Phe Arg Val Arg Phe
 130 135 140

Asn Pro Asp Gly Pro Ile Arg Asp Val Asp Arg Gly Pro Ile Leu Gln
 145 150 155 160
 Gln Gln Leu Asn Trp Ile Arg Lys Gln Glu Gln Ser Lys Gly Phe Asp
 165 170 175
 Pro Lys Met Gly Phe Thr Lys Glu Gly Phe Leu Lys Phe Glu Thr Lys
 180 185 190
 Asp Leu Asn Val Ile Ile Tyr Gly Asn Phe Lys Thr Arg Val Thr Arg
 195 200 205
 Lys Arg Asp Gly Lys Gly Ile Met Glu Asn Asn Glu Val Pro Ala Gly
 210 215 220
 Ser Leu Gly Asn Lys Cys Arg Gly Leu Met Phe Val Asp Arg Leu Tyr
 225 230 235 240
 Gly Thr Ala Ile Ala Ser Val Asn Glu Asn Tyr Arg Asn Asp Pro Asp
 245 250 255
 Arg Lys Glu Gly Phe Tyr Gly Ala Gly Glu Val Asn Cys Glu Phe Trp
 260 265 270
 Asp Ser Glu Gln Asn Arg Asn Lys Tyr Ile Leu Glu Arg Thr Gly Ile
 275 280 285
 Ala Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Tyr Asn Tyr Asn Gln Ser Asp
 290 295 300
 Leu Ile Ala Pro Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Phe Tyr Ile Pro Met
 305 310 315 320
 Tyr Phe Ala Ala Pro Trp Val Val Lys Gly Cys Ser Gly Asn Ser
 325 330 335
 Asp Glu Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Thr
 340 345 350
 Tyr Met Asn Thr Gly Gly Thr Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Asn Leu
 355 360 365
 Ala Tyr Met Gly Ala Gln Cys Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr
 370 375 380
 Gly Asp Gly Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Gln Ala Phe Ser Leu Leu
 385 390 395 400
 Gln Gly Lys Glu Phe Glu Asn Gln Val Leu Asn Lys Arg Ala Val Met
 405 410 415
 Pro Pro Lys Tyr Val Phe Gly Tyr Phe Gln Gly Val Phe Gly Ile Ala
 420 425 430
 Ser Leu Leu Arg Glu Gln Arg Pro Glu Gly Gly Asn Asn Ile Ser Val
 435 440 445

Gln Glu Ile Val Glu Gly Tyr Gln Ser Asn Asn Phe Pro Leu Glu Gly
 450 455 460

Leu Ala Val Asp Val Asp Met Gln Gln Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr
 465 470 475 480

Lys Ile Glu Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Thr Gly Gly Asp Ser
 485 490 495

Asn Asn Lys Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys
 500 505 510

Gln Thr Asn Val Thr Cys Phe Leu Arg Asn Asp Asn Gly Gly Ala Asp
 515 520 525

Tyr Glu Val Asn Gln Thr Leu Arg Glu Lys Gly Leu Tyr Thr Lys Asn
 530 535 540

Asp Ser Leu Thr Asn Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Asp Gly Pro Ser
 545 550 555 560

Asp Ala Tyr Ile Gly His Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Asn Cys Asp
 565 570 575

Ala Leu Phe Pro Asp Trp Gly Arg Pro Gly Val Ala Glu Trp Trp Gly
 580 585 590

Asp Asn Tyr Ser Lys Leu Phe Lys Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Met Thr Val Pro Ala Met Met Pro His Lys Val Gly Asp Ala Val
 610 615 620

Asp Thr Arg Ser Pro Tyr Gly Trp Pro Asn Glu Asn Asp Pro Ser Asn
 625 630 635 640

Gly Arg Tyr Asn Trp Lys Ser Tyr His Pro Gln Val Leu Val Thr Asp
 645 650 655

Met Arg Tyr Glu Asn His Gly Arg Glu Pro Met Phe Thr Gln Arg Asn
 660 665 670

Met His Ala Tyr Thr Leu Cys Glu Ser Thr Arg Lys Glu Gly Ile Val
 675 680 685

Ala Asn Ala Asp Thr Leu Thr Lys Phe Arg Arg Ser Tyr Ile Ile Ser
 690 695 700

Arg Gly Gly Tyr Ile Gly Asn Gln His Phe Gly Gly Met Trp Val Gly
 705 710 715 720

Asp Asn Ser Ser Ser Gln Arg Tyr Leu Gln Met Met Ile Ala Asn Ile
 725 730 735

Val Asn Met Asn Met Ser Cys Leu Pro Leu Val Gly Ser Asp Ile Gly
 740 745 750

Gly Phe Thr Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Val Cys Pro Gly Asp Leu Met
 755 760 765
 Val Arg Phe Val Gln Ala Gly Cys Leu Leu Pro Trp Phe Arg Asn His
 770 775 780
 Tyr Gly Arg Leu Val Glu Gly Lys Gln Glu Gly Lys Tyr Tyr Gln Glu
 785 790 795 800
 Leu Tyr Met Tyr Lys Asp Glu Met Ala Thr Leu Arg Lys Phe Ile Glu
 805 810 815
 Phe Arg Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn
 820 825 830
 Ala Ala Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn
 835 840 845
 Asp Arg Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly
 850 855 860
 His Asp Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr
 865 870 875 880
 Thr Ser Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe
 885 890 895
 Gly Pro Asp Tyr Asp Thr Lys Arg Leu Asp Ser Ala Leu Asp Gly Gly
 900 905 910
 Gln Met Ile Lys Asn Tyr Ser Val Pro Gln Ser Asp Ser Pro Ile Phe
 915 920 925
 Val Arg Glu Gly Ala Ile Leu Pro Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Gly Ser
 930 935 940
 Asn Lys Ser Met Asn Thr Tyr Thr Asp Lys Asp Pro Leu Val Phe Glu
 945 950 955 960
 Val Phe Pro Leu Gly Asn Asn Arg Ala Asp Gly Met Cys Tyr Leu Asp
 965 970 975
 Asp Gly Gly Ile Thr Thr Asp Ala Glu Asp His Gly Lys Phe Ser Val
 980 985 990
 Ile Asn Val Glu Ala Leu Arg Lys Gly Val Thr Thr Ile Lys Phe
 995 1000 1005
 Ala Tyr Asp Thr Tyr Gln Tyr Val Phe Asp Gly Pro Phe Tyr Val Arg
 1010 1015 1020
 Ile Arg Asn Leu Thr Thr Ala Ser Lys Ile Asn Val Ser Ser Gly Ala
 1025 1030 1035 1040
 Gly Glu Glu Asp Met Thr Pro Thr Ser Ala Asn Ser Arg Ala Ala Leu
 1045 1050 1055

Phe Ser Asp Gly Gly Val Gly Glu Tyr Trp Ala Asp Asn Asp Thr Ser
 1060 1065 1070

Ser Leu Trp Met Lys Leu Pro Asn Leu Val Leu Gln Asp Ala Val Ile
 1075 1080 1085

Thr Ile Thr
 1090

(2)配列番号 3 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 3267塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 二本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : DNA (genomic)

(xi)配列 : 配列番号 3 :

| | |
|--|------|
| ATGTTTCAA CCCTTGC GTT TGTGCACCT AGTGCCTGG GAGCCAGTAC CTTCGTAGGG | 60 |
| GCGGAGGTCA GGTCAAATGT TCGTATCCAT TCCGCTTTTC CAGCTGTGCA CACAGCTACT | 120 |
| CGCAAAACCA ATCGCCTCAA TGTATCCATG ACCGCATTGT CCGACAAACA AACGGCTACT | 180 |
| GCGGGTAGTA CAGACAATCC GGACGGTATC GACTACAAGA CCTACGATTA CGTCGGAGTA | 240 |
| TGGGGTTTCA GCCCCCTCTC CAACACGAAC TGGTTTGCTG CCGGCTCTTC TACCCCGGGT | 300 |
| GGCATCACTG ATTGGACGGC TACAATGAAT GTCAACTTCG ACCGTATCGA CAATCCGTCC | 360 |
| ATCACTGTCC AGCATCCCCTG TCAGGTTCAAG GTCACGTCAAT ACAACAACAA CAGCTACAGG | 420 |
| GTTCGCTTCA ACCCTGATGG CCCTATTCTG GATGTGACTC GTGGGCCTAT CCTCAAGCAG | 480 |
| CAACTAGATT GGATTCGAAC GCAGGGAGCTG TCAGAGGGAT GTGATCCGG AATGACTTTC | 540 |
| ACATCAGAAG GTTCTTGAC TTTGAGACC AAGGATCTAA GCGTCATCAT CTACGGAAAT | 600 |
| TTCAAGACCA GAGTTACGAG AAAGTCTGAC GGCAAGGTCA TCATGGAAAA TGATGAAGTT | 660 |
| GGAACTGCAT CGTCCGGGAA CAAGTGCCGG GGATTGATGT TCGTTGATAG ATTATACGGT | 720 |
| AACGCTATCG CTTCCGTCAA CAAGAACTTC CGCAACGACG CGGTCAAGCA GGAGGGATTG | 780 |
| TATGGTGCAG GTGAAGTCAT CTGTAAGTAC CAGGACACCT ACATCTTAGA ACGCACTGGA | 840 |
| ATCGCCATGA CAAATTACAA CTACGATAAC TTGAACCTATA ACCAGTGGGA CCTTAGACCT | 900 |
| CCGCATCATG ATGGTGCCT CAACCCAGAC TATTATTC CAATGTACTA CGCAGCACCT | 960 |
| TGGTTGATCG TTAATGGATG CGCCGGTACT TCGGAGCAGT ACTCGTATGG ATGGTTCATG | 1020 |

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| GACAATGTCT | CTCAATCTTA | CATGAATACT | GGAGATACTA | CCTGGAATT | TGGACAAAGAG | 1080 |
| GACCTGGCAT | ACATGGGC | GCAGTATGGA | CCATTTGACC | AACATTTGT | TTACGGT | 1140 |
| GGGGGTGGGA | TGGAATGT | GGTCACAGCG | TTCTCTCTC | TACAAGGCAA | GGAGTTCGAG | 1200 |
| AACCAAGTTC | TCAACAAACG | TTCAGTAATG | CCTCCGAAAT | ACGTCTTGG | TTTCTTCCAG | 1260 |
| GGTGT | GGACTTCTTC | CTTGTGAGA | GCGCATATGC | CAGCAGGTGA | GAACAAACATC | 1320 |
| TCAGTCGAAG | AAATTGTAGA | AGGTTATCAA | AACAACAATT | TCCCTTCGA | GGGGCTCGCT | 1380 |
| GTGGACGTGG | ATATGCAAGA | CAACTTGC | GTGTTCACCA | CGAAGGGCGA | ATTTTGGACC | 1440 |
| GCAAACAGGG | TGGGTACTGG | CGGGGATCCA | AACAACCGAT | CGGTTTTGA | ATGGGCACAT | 1500 |
| GACAAAGGCC | TTGTTGTCA | GACAAATATA | ACTTGCTTCC | TGAGGAATGA | TAACGAGGGG | 1560 |
| CAAGACTACG | AGGTCAATCA | GACGTTAAGG | GAGAGGCAGT | TGTACACGAA | GAACGACTCC | 1620 |
| CTGACGGGTA | CGGATTTGG | AATGACCGAC | GACGGCCCCA | GCGATGCGTA | CATCGGT | 1680 |
| CTGGACTATG | GGGGTGGAGT | AGAATGTGAT | GCAC | CAGACTGGGG | ACGGCCTGAC | 1740 |
| GTGGCCGAAT | GGTGGGGAAA | TAACTATAAG | AAACTGTTCA | GCATTGGT | CGACTTCGTC | 1800 |
| TGGCAAGACA | TGACTGTTCC | AGCAATGATG | CCGCACAAAA | TTGGCGATGA | CATCAATGTG | 1860 |
| AAACCGGATG | GGAATTGGCC | GAATGCGGAC | GATCCGTCCA | ATGGACAATA | CAACTGGAAG | 1920 |
| ACGTACCATC | CCCAAGTGCT | TGTAACTGAT | ATGCGTTATG | AGAACATGG | TGGGAACCG | 1980 |
| ATGGTCACTC | AACGCAACAT | TCATGCGTAT | ACACTGTGCG | AGTCTACTAG | GAAGGAAGGG | 2040 |
| ATCGTGGAAA | ACGCAGACAC | TCTAACGAAG | TTCCGCCGTA | GCTACATTAT | CAGTCGTGGT | 2100 |
| GGTTACATTG | GTAACCAGCA | TTTCGGGGT | ATGTGGTGG | GAGACAACTC | TACTACATCA | 2160 |
| AACTACATCC | AAATGATGAT | TGCCAACAAAT | ATTAACATGA | ATATGTTTG | CTTGCCTCTC | 2220 |
| GTCCGGCTCCG | ACATTGGAGG | ATTCAACCTCA | TACGACAATG | AGAACATCG | ACGCCGTGT | 2280 |
| ACCGGGGACT | TGATGGTGAG | GTATGTCAG | GCGGGCTGCC | TGTTGCCGTG | GTTCAGGAAC | 2340 |
| CACTATGATA | GGTGGATCGA | GTCCAAGGAC | CACGGAAAGG | ACTACCAGGA | GCTGTACATG | 2400 |
| TATCCGAATG | AAATGGATAC | GTTGAGGAAG | TTCGTTGAAT | TCCGTTATCG | CTGGCAGGAA | 2460 |
| GTGTTGTACA | CGGCCATGTA | CCAGAACGCG | GCTTTCGAA | AGCCGATTAT | CAAGGCTGCT | 2520 |
| TCGATGTACA | ATAACGACTC | AAACGTTCGC | AGGGCGCAGA | ACGATCATT | CTTCTTGGT | 2580 |
| GGACATGATG | GATATCGCAT | TCTGTGCGCG | CCTGTTGTGT | GGGAGAATT | GACCGAACGC | 2640 |
| GAATTGTACT | TGCCCGTGT | GACCCAATGG | TACAAATTG | GTCCCGACTT | TGACACCAAG | 2700 |

| | |
|--|------|
| CCTCTGGAAG GAGCGATGAA CGGAGGGGAC CGAATTACA ACTACCCGT ACCGCAAAGT | 2760 |
| GAATCACCAA TCTTCGTGAG AGAAGGTGCG ATTCTCCCTA CCCGCTACAC GTTGAACGGT | 2820 |
| GAAAACAAAT CATTGAACAC GTACACGGAC GAAGATCCGT TGGTGTGAA AGTATTCCCC | 2880 |
| CTCGGAAACA ACCGTGCCGA CGGTATGTGT TATCTTGATG ATGGCGGTGT GACCACCAAT | 2940 |
| GCTGAAGACA ATGGCAAGTT CTCTGTCGTC AAGGTGGCAG CGGAGCAGGA TGGTGGTACG | 3000 |
| GAGACGATAA CGTTTACGAA TGATTGCTAT GAGTACGTT TCGGTGGACC GTTCTACGTT | 3060 |
| CGAGTGCAGCG GCGCTCAGTC GCCGTCGAAC ATCCACGTGT CTTCTGGAGC GGGTTCTCAG | 3120 |
| GACATGAAGG TGAGCTCTGC CACTTCCAGG GCTGCGCTGT TCAATGACGG GGAGAACGGT | 3180 |
| GATTCTGGG TTGACCAAGGA GACAGATTCT CTGTGGCTGA AGTTGCCAA CGTTGTTCTC | 3240 |
| CCGGACGCTG TGATCACAAT TACCTAA | 3267 |

(2)配列番号 4 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 3276塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 二本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : DNA (genomic)

(xi)配列 : 配列番号 4 :

| | |
|---|-----|
| ATGTATCCAA CCCTCACCTT CGTGGCGCCT AGTGCCTAG GGGCCAGAAC TTTCACGTGT | 60 |
| GTGGGCATTT TTAGGTCACA CATTCTTATT CATTGGTTG TTCCAGCGGT GCGTCTAGCT | 120 |
| GTGCGCAAAA GCAACCGCCT CAATGTATCC ATGTCCGCTT TGTCGACAA ACCGACTGCT | 180 |
| GTTACTGGAG GGAAGGACAA CCCGGACAAT ATCAATTACA CCACCTATGA CTACGTCCCT | 240 |
| GTGTGGCGCT TCGACCCCT CAGCAATACG AACTGGTTG CTGCCGGATC TTCCACTCCC | 300 |
| GGCGATATTG ACGACTGGAC GGCAGACAATG AATGTGAATC TCGACCGTAT CGACAATCCA | 360 |
| TCCCTCACTC TCGAGAAACC GGTTCAAGGTT CAGGTCACGT CATAACAAGAA CAATTGTTTC | 420 |
| AGGGTTCGCT TCAACCCCTGA TGGTCTATT CGCGATGTGG ATCGTGGGCC TATCCTCCAG | 480 |
| CAGCAACTAA ATTGGATCCG GAAGCAGGAG CAGTCGAAGG GGTTTGTCC TAAGATGGC | 540 |
| TTCACAAAAG AAGGTTCTT GAAATTGAG ACCAAGGATC TGAACGTTAT CATATATGGC | 600 |
| AATTTTAAGA CTAGAGTTAC GAGGAAGAGG GATGGAAAAG GGATCATGGA GAATAATGAA | 660 |

| | |
|--|------|
| GTGCCGGCAG GATCGTTAGG GAACAAGTGC CGGGGATTGA TGTTTGTCA CAGGTTGTAC | 720 |
| GGCACTGCCA TCGCTTCCGT TAATGAAAAT TACCGCAACG ATCCCACAG GAAAGAGGGG | 780 |
| TTCTATGGTG CAGGAGAAGT AAACTGCGAG TTTTGGGACT CCGAACAAAA CAGGAACAAG | 840 |
| TACATCTTAG AACGAACCTGG AATGCCATG ACAAAATTACA ATTATGACAA CTATAACTAC | 900 |
| AACCACTCAG ATCTTATTGC TCCAGGATAT CCTTCCGACC CGAACCTCTA CATTCCCATG | 960 |
| TATTTGCAG CACCTGGGT AGTTGTTAAG GGATGCAGTG GCAACAGCGA TGAACAGTAC | 1020 |
| TCGTACGGAT GGTTTATGGA TAATGTCCTC CAAACTTACA TGAATACTGG TGGTACTTCC | 1080 |
| TGGAACGTG GAGAGGAGAA CTTGGCATAAC ATGGGAGCAC AGTGCAGTCC ATTTGACCAA | 1140 |
| CATTTGTGT ATGGTGATGG AGATGGTCTT GAGGATGTTG TCCAAGCGTT CTCTCTTCTG | 1200 |
| CAAGGCAAAG AGTTTGAGAA CCAAGTTCTG AACAAACGTG CCGTAATGCC TCCGAAATAT | 1260 |
| GTGTTGGTT ACTTCAGGG AGTCTTGGG ATTGCTTCCT TGTTGAGAGA GCAAAGACCA | 1320 |
| GAGGGTGGTA ATAACATCTC TGTCAAGAG ATTGTCGAAG GTTACCAAAG CAATAACTTC | 1380 |
| CCTTAGACG GGTTAGCCGT AGATGTGGAT ATGCAACAAG ATTTGCGCGT GTTCACCACG | 1440 |
| AAGATTGAAT TTTGGACGGC AAATAAGGTA GGCACCGGGG GAGACTCGAA TAACAAGTCG | 1500 |
| GTGTTGAAT GGGCACATGA CAAAGGCCTT GTATGTCAGA CGAATGTTAC TTGCTTCTG | 1560 |
| AGAAACGACA ACGGCGGGGC AGATTACGAA GTCAATCAGA CATTGAGGGA GAAGGGTTTG | 1620 |
| TACACGAAGA ATGACTCACT GACGAACACT AACCTCGAA CTACCAACGA CGGGCCGAGC | 1680 |
| GATGCGTACA TTGGACATCT GGACTATGGT GGCGGAGGGG ATTGTGATGC ACTTTCCCA | 1740 |
| GACTGGGTC GACCGGGTGT GGCTGAATGG TGGGGTGATA ACTACAGCAA GCTCTCAA | 1800 |
| ATTGGTCTGG ATTCGTCTG GCAAGACATG ACAGTTCCAG CTATGATGCC ACACAAAGTT | 1860 |
| GGCGACGCAG TCGATACGAG ATCACCTTAC GGCTGGCCGA ATGAGAATGA TCCTTGAAC | 1920 |
| GGACGATACA ATTGGAAATC TTACCATCCA CAAGTTCTCG TAACTGATAT GCGATATGAG | 1980 |
| AATCATGGAA GGGAAACCGAT GTTCACTCAA CGCAATATGC ATGCGTACAC ACTCTGTGAA | 2040 |
| TCTACGAGGA AGGAAGGGAT TGTTGCAAAT GCAGACACTC TAACGAAGTT CCGCCGAGT | 2100 |
| TATATTATCA GTCGTGGAGG TTACATTGGC AACCAAGCATT TTGGAGGAAT GTGGGTTGGA | 2160 |
| GACAACTCTT CCTCCCAAAG ATACCTCCAA ATGATGATCG CGAACATCGT CAACATGAAC | 2220 |
| ATGTCTTGCC TTCCACTAGT TGGGTCCGAC ATTGGAGGTT TTACTTCGTA TGATGGACGA | 2280 |
| AACGTGTGTC CGGGGGATCT AATGGTAAGA TTCGTGCAGG CGGGTTGCTT ACTACCGTGG | 2340 |

| | |
|--|------|
| TTCAGAAACC ACTATGGTAG GTTGGTCGAG GGCAAGCAAG AGGGAAAATA CTATCAAGAA | 2400 |
| CTGTACATGT ACAAGGACGA GATGGCTACA TTGAGAAAAT TCATTGAATT CCGTTACCGC | 2460 |
| TGGCAGGAGG TGTTGTACAC TGCTATGTAC CAGAATGCGG CTTTCGGAA ACCGATTATC | 2520 |
| AAGGCAGCTT CCATGTACGA CAACGACAGA AACGTTCGCG GCGCACAGGA TGACCACTTC | 2580 |
| CTTCTCGCG GACACGATGG ATATCGTATT TTGTGTGCAC CTGTTGTGTG GGAGAAATACA | 2640 |
| ACCAGTCGCG ATCTGTACTT GCCTGTGCTG ACCAAATGGT ACAAAATCGG CCCTGACTAT | 2700 |
| GACACCAAGC GCCTGGATTG TGCCTGGAT GGAGGGCAGA TGATTAAGAA CTATTCTGTG | 2760 |
| CCACAAAGCG ACTCTCCGAT ATTTGTGAGG GAAGGGAGCTA TTCTCCGTAC CCGCTACACG | 2820 |
| TTGGACGGTT CGAACAAAGTC AATGAACACG TACACAGACA AAGACCCGTT GGTGTTTGAG | 2880 |
| GTATTCCCTC TTGGAAACAA CCGTGCCGAC GGTATGTGTT ATCTTGATGA TGGCGGTATT | 2940 |
| ACTACAGATG CTGAGGACCA TGGCAAATTG TCTGTTATCA ATGTCGAAGC CTTACGGAAA | 3000 |
| GGTGTACGA CGACGATCAA GTTTGCCTAT GACACTTATC AATACGTATT TGATGGTCCA | 3060 |
| TTCTACGTTG GAATCCGTA TCTTACGACT GCATCAAAAA TAAACGTGTC TTCTGGAGCG | 3120 |
| GGTGAAGAGG ACATGACACC GACCTCTGCG AACTCGAGGG CAGCTTGTT CAGTGATGGA | 3180 |
| GGTGTGAGG AATACTGGGC TGACAATGAT ACGTCTTCTC TGTGGATGAA GTTGCCAAAC | 3240 |
| CTGGTTCTGC AAGACGCTGT GATTACCAATT ACGTAG | 3276 |

(2)配列番号 5 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 1066アミノ酸
- (B)型 : アミノ酸
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : タンパク質

(xi)配列 : 配列番号 5 :

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Gly | Phe | Ser | Asp | Pro | Leu | Asn | Phe | Cys | Lys | Ala | Glu | Asp | Tyr |
| 1 | 5 | | | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Tyr | Ser | Val | Ala | Leu | Asp | Trp | Lys | Gly | Pro | Gln | Lys | Ile | Ile | Gly | Val |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | | |
| Asp | Thr | Thr | Pro | Pro | Lys | Ser | Thr | Lys | Phe | Pro | Lys | Asn | Trp | His | Gly |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | |
| Val | Asn | Leu | Arg | Phe | Asp | Asp | Gly | Thr | Leu | Gly | Val | Val | Gln | Phe | Ile |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | |

Arg Pro Cys Val Trp Arg Val Arg Tyr Asp Pro Gly Phe Lys Thr Ser
 65 70 75 80
 Asp Glu Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Arg Thr Ile Val Gln Asp Tyr Met
 85 90 95
 Ser Thr Leu Ser Asn Lys Leu Asp Thr Tyr Arg Gly Leu Thr Trp Glu
 100 105 110
 Thr Lys Cys Glu Asp Ser Gly Asp Phe Phe Thr Phe Ser Ser Lys Val
 115 120 125
 Thr Ala Val Glu Lys Ser Glu Arg Thr Arg Asn Lys Val Gly Asp Gly
 130 135 140
 Leu Arg Ile His Leu Trp Lys Ser Pro Phe Arg Ile Gln Val Val Arg
 145 150 155 160
 Thr Leu Thr Pro Leu Lys Asp Pro Tyr Pro Ile Pro Asn Val Ala Ala
 165 170 175
 Ala Glu Ala Arg Val Ser Asp Lys Val Val Trp Gln Thr Ser Pro Lys
 180 185 190
 Thr Phe Arg Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr
 195 200 205
 Val Leu Asp Ile Val Lys Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly
 210 215 220
 Glu Met Gly Gly Ile Gln Phe Met Lys Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr
 225 230 235 240
 Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr Ala Gln Gly Ala
 245 250 255
 Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr Leu Asp
 260 265 270
 Val Asn Ser Asn Pro Glu His Lys Asn Ile Thr Ala Thr Phe Ile Asp
 275 280 285
 Asn Tyr Ser Gln Ile Ala Ile Asp Phe Gly Lys Thr Asn Ser Gly Tyr
 290 295 300
 Ile Lys Leu Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ile Asp Cys Tyr Gly Ile Ser
 305 310 315 320
 Ala Asp Thr Val Pro Glu Ile Val Arg Leu Tyr Thr Gly Leu Val Gly
 325 330 335
 Arg Ser Lys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile Leu Gly Ala His Gln Ala Cys
 340 345 350
 Tyr Gly Tyr Gln Gln Glu Ser Asp Leu Tyr Ser Val Val Gln Gln Tyr
 355 360 365

Arg Asp Cys Lys Phe Pro Leu Asp Gly Ile His Val Asp Val Asp Val
 370 375 380
 Gln Asp Gly Phe Arg Thr Phe Thr Thr Asn Pro His Thr Phe Pro Asn
 385 390 395 400
 Pro Lys Glu Met Phe Thr Asn Leu Arg Asn Asn Gly Ile Lys Cys Ser
 405 410 415
 Thr Asn Ile Thr Pro Val Ile Ser Ile Asn Asn Arg Glu Gly Gly Tyr
 420 425 430
 Ser Thr Leu Leu Glu Gly Val Asp Lys Lys Tyr Phe Ile Met Asp Asp
 435 440 445
 Arg Tyr Thr Glu Gly Thr Ser Gly Asn Ala Lys Asp Val Arg Tyr Met
 450 455 460
 Tyr Tyr Gly Gly Asn Lys Val Glu Val Asp Pro Asn Asp Val Asn
 465 470 475 480
 Gly Arg Pro Asp Phe Lys Asp Asn Tyr Asp Phe Pro Ala Asn Phe Asn
 485 490 495
 Ser Lys Gln Tyr Pro Tyr His Gly Gly Val Ser Tyr Gly Tyr Gly Asn
 500 505 510
 Gly Ser Ala Gly Phe Tyr Pro Asp Leu Asn Arg Lys Glu Val Arg Ile
 515 520 525
 Trp Trp Gly Met Gln Tyr Lys Tyr Leu Phe Asp Met Gly Leu Glu Phe
 530 535 540
 Val Trp Gln Asp Met Thr Thr Pro Ala Ile His Thr Ser Tyr Gly Asp
 545 550 555 560
 Met Lys Gly Leu Pro Thr Arg Leu Leu Val Thr Ser Asp Ser Val Thr
 565 570 575
 Asn Ala Ser Glu Lys Lys Leu Ala Ile Glu Thr Trp Ala Leu Tyr Ser
 580 585 590
 Tyr Asn Leu His Lys Ala Thr Trp His Gly Leu Ser Arg Leu Glu Ser
 595 600 605
 Arg Lys Asn Lys Arg Asn Phe Ile Leu Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Gly
 610 615 620
 Ala Tyr Arg Phe Ala Gly Leu Trp Thr Gly Asp Asn Ala Ser Asn Trp
 625 630 635 640
 Glu Phe Trp Lys Ile Ser Val Ser Gln Val Leu Ser Leu Gly Leu Asn
 645 650 655
 Gly Val Cys Ile Ala Gly Ser Asp Thr Gly Gly Phe Glu Pro Tyr Arg
 660 665 670

Asp Ala Asn Gly Val Glu Glu Lys Tyr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Ile
 675 680 685
 Arg Trp Tyr Thr Gly Ser Phe Leu Leu Pro Trp Leu Arg Asn His Tyr
 690 695 700
 Val Lys Lys Asp Arg Lys Trp Phe Gln Glu Pro Tyr Ser Tyr Pro Lys
 705 710 715 720
 His Leu Glu Thr His Pro Glu Leu Ala Asp Gln Ala Trp Leu Tyr Lys
 725 730 735
 Ser Val Leu Glu Ile Cys Arg Tyr Tyr Val Glu Leu Arg Tyr Ser Leu
 740 745 750
 Ile Gln Leu Leu Tyr Asp Cys Met Phe Gln Asn Val Val Asp Gly Met
 755 760 765
 Pro Ile Thr Arg Ser Met Leu Leu Thr Asp Thr Glu Asp Thr Thr Phe
 770 775 780
 Phe Asn Glu Ser Gln Lys Phe Leu Asp Asn Gln Tyr Met Ala Gly Asp
 785 790 795 800
 Asp Ile Leu Val Ala Pro Ile Leu His Ser Arg Lys Glu Ile Pro Gly
 805 810 815
 Glu Asn Arg Asp Val Tyr Leu Pro Leu Tyr His Thr Trp Tyr Pro Ser
 820 825 830
 Asn Leu Arg Pro Trp Asp Asp Gln Gly Val Ala Leu Gly Asn Pro Val
 835 840 845
 Glu Gly Gly Ser Val Ile Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Val Ala Pro Glu
 850 855 860
 Asp Tyr Asn Leu Phe His Ser Val Val Pro Val Tyr Val Arg Glu Gly
 865 870 875 880
 Ala Ile Ile Pro Gln Ile Glu Val Arg Gln Trp Thr Gly Gln Gly Gly
 885 890 895
 Ala Asn Arg Ile Lys Phe Asn Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Lys Glu Tyr
 900 905 910
 Cys Thr Tyr Leu Asp Asp Gly Val Ser Arg Asp Ser Ala Pro Glu Asp
 915 920 925
 Leu Pro Gln Tyr Lys Glu Thr His Glu Gln Ser Lys Val Glu Gly Ala
 930 935 940
 Glu Ile Ala Lys Gln Ile Gly Lys Lys Thr Gly Tyr Asn Ile Ser Gly
 945 950 955 960
 Thr Asp Pro Glu Ala Lys Gly Tyr His Arg Lys Val Ala Val Thr Gln
 965 970 975

Thr Ser Lys Asp Lys Thr Arg Thr Val Thr Ile Glu Pro Lys His Asn
 980 985 990
 Gly Tyr Asp Pro Ser Lys Glu Val Gly Asp Tyr Tyr Thr Ile Ile Leu
 995 1000 1005
 Trp Tyr Ala Pro Gly Phe Asp Gly Ser Ile Val Asp Val Ser Lys Thr
 1010 1015 1020
 Thr Val Asn Val Glu Gly Gly Val Glu His Gln Val Tyr Lys Asn Ser
 1025 1030 1035 1040
 Asp Leu His Thr Val Val Ile Asp Val Lys Glu Val Ile Gly Thr Thr
 1045 1050 1055
 Lys Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Ala Ala
 1060 1065

(2)配列番号 6 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 1070アミノ酸
- (B)型 : アミノ酸
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : タンパク質

(xi)配列 : 配列番号 6 :

Met Ala Gly Leu Ser Asp Pro Leu Asn Phe Cys Lys Ala Glu Asp Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Ala Lys Gly Trp Ser Gly Pro Gln Lys Ile Ile Arg Tyr
 20 25 30
 Asp Gln Thr Pro Pro Gln Gly Thr Lys Asp Pro Lys Ser Trp His Ala
 35 40 45
 Val Asn Leu Pro Phe Asp Asp Gly Thr Met Cys Val Val Gln Phe Val
 50 55 60
 Arg Pro Cys Val Trp Arg Val Arg Tyr Asp Pro Ser Val Lys Thr Ser
 65 70 75 80
 Asp Glu Tyr Gly Asp Glu Asn Thr Arg Thr Ile Val Gln Asp Tyr Met
 85 90 95
 Thr Thr Leu Val Gly Asn Leu Asp Ile Phe Arg Gly Leu Thr Trp Val
 100 105 110
 Ser Thr Leu Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Tyr Thr Phe Lys Ser Glu Val
 115 120 125

Thr Ala Val Asp Glu Thr Glu Arg Thr Arg Asn Lys Val Gly Asp Gly
 130 135 140
 Leu Lys Ile Tyr Leu Trp Lys Asn Pro Phe Arg Ile Gln Val Val Arg
 145 150 155 160
 Leu Leu Thr Pro Leu Val Asp Pro Phe Pro Ile Pro Asn Val Ala Asn
 165 170 175
 Ala Thr Ala Arg Val Ala Asp Lys Val Val Trp Gln Thr Ser Pro Lys
 180 185 190
 Thr Phe Arg Lys Asn Leu His Pro Gln His Lys Met Leu Lys Asp Thr
 195 200 205
 Val Leu Asp Ile Ile Lys Pro Gly His Gly Glu Tyr Val Gly Trp Gly
 210 215 220
 Glu Met Gly Gly Ile Glu Phe Met Lys Glu Pro Thr Phe Met Asn Tyr
 225 230 235 240
 Phe Asn Phe Asp Asn Met Gln Tyr Gln Gln Val Tyr Ala Gln Gly Ala
 245 250 255
 Leu Asp Ser Arg Glu Pro Leu Tyr His Ser Asp Pro Phe Tyr Leu Asp
 260 265 270
 Val Asn Ser Asn Pro Glu His Lys Asn Ile Thr Ala Thr Phe Ile Asp
 275 280 285
 Asn Tyr Ser Gln Ile Ala Ile Asp Phe Gly Lys Thr Asn Ser Gly Tyr
 290 295 300
 Ile Lys Leu Gly Thr Arg Tyr Gly Ile Asp Cys Tyr Gly Ile Ser
 305 310 315 320
 Ala Asp Thr Val Pro Glu Ile Val Arg Leu Tyr Thr Gly Leu Val Gly
 325 330 335
 Arg Ser Lys Leu Lys Pro Arg Tyr Ile Leu Gly Ala His Gln Ala Cys
 340 345 350
 Tyr Gly Tyr Gln Gln Glu Ser Asp Leu His Ala Val Val Gln Gln Tyr
 355 360 365
 Arg Asp Thr Lys Phe Pro Leu Asp Gly Leu His Val Asp Val Asp Phe
 370 375 380
 Gln Asp Asn Phe Arg Thr Phe Thr Thr Asn Pro Ile Thr Phe Pro Asn
 385 390 395 400
 Pro Lys Glu Met Phe Thr Asn Leu Arg Asn Asn Gly Ile Lys Cys Ser
 405 410 415
 Thr Asn Ile Thr Pro Val Ile Ser Ile Arg Asp Arg Pro Asn Gly Tyr
 420 425 430

Ser Thr Leu Asn Glu Gly Tyr Asp Lys Lys Tyr Phe Ile Met Asp Asp
 435 440 445
 Arg Tyr Thr Glu Gly Thr Ser Gly Asp Pro Gln Asn Val Arg Tyr Ser
 450 455 460
 Phe Tyr Gly Gly Gly Asn Pro Val Glu Val Asn Pro Asn Asp Val Trp
 465 470 475 480
 Ala Arg Pro Asp Phe Gly Asp Asn Tyr Asp Phe Pro Thr Asn Phe Asn
 485 490 495
 Cys Lys Asp Tyr Pro Tyr His Gly Gly Val Ser Tyr Gly Tyr Gly Asn
 500 505 510
 Gly Thr Pro Gly Tyr Tyr Pro Asp Leu Asn Arg Glu Glu Val Arg Ile
 515 520 525
 Trp Trp Gly Leu Gln Tyr Glu Tyr Leu Phe Asn Met Gly Leu Glu Phe
 530 535 540
 Val Trp Gln Asp Met Thr Thr Pro Ala Ile His Ser Ser Tyr Gly Asp
 545 550 555 560
 Met Lys Gly Leu Pro Thr Arg Leu Leu Val Thr Ala Asp Ser Val Thr
 565 570 575
 Asn Ala Ser Glu Lys Lys Leu Ala Ile Glu Ser Trp Ala Leu Tyr Ser
 580 585 590
 Tyr Asn Leu His Lys Ala Thr Phe His Gly Leu Gly Arg Leu Glu Ser
 595 600 605
 Arg Lys Asn Lys Arg Asn Phe Ile Leu Gly Arg Gly Ser Tyr Ala Gly
 610 615 620
 Ala Tyr Arg Phe Ala Gly Leu Trp Thr Gly Asp Asn Ala Ser Thr Trp
 625 630 635 640
 Glu Phe Trp Lys Ile Ser Val Ser Gln Val Leu Ser Leu Gly Leu Asn
 645 650 655
 Gly Val Cys Ile Ala Gly Ser Asp Thr Gly Gly Phe Glu Pro Ala Arg
 660 665 670
 Thr Glu Ile Gly Glu Glu Lys Tyr Cys Ser Pro Glu Leu Leu Ile Arg
 675 680 685
 Trp Tyr Thr Gly Ser Phe Leu Leu Pro Trp Leu Arg Asn His Tyr Val
 690 695 700
 Lys Lys Asp Arg Lys Trp Phe Gln Glu Pro Tyr Ala Tyr Pro Lys His
 705 710 715 720
 Leu Glu Thr His Pro Glu Leu Ala Asp Gln Ala Trp Leu Tyr Lys Ser
 725 730 735

Val Leu Glu Ile Cys Arg Tyr Trp Val Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Ile
 740 745 750
 Gln Leu Leu Tyr Asp Cys Met Phe Gln Asn Val Val Asp Gly Met Pro
 755 760 765
 Leu Ala Arg Ser Met Leu Leu Thr Asp Thr Glu Asp Thr Thr Phe Phe
 770 775 780
 Asn Glu Ser Gln Lys Phe Leu Asp Asn Gln Tyr Met Ala Gly Asp Asp
 785 790 795 800
 Ile Leu Val Ala Pro Ile Leu His Ser Arg Asn Glu Val Pro Gly Glu
 805 810 815
 Asn Arg Asp Val Tyr Leu Pro Leu Phe His Thr Trp Tyr Pro Ser Asn
 820 825 830
 Leu Arg Pro Trp Asp Asp Gln Gly Val Ala Leu Gly Asn Pro Val Glu
 835 840 845
 Gly Gly Ser Val Ile Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Val Ala Pro Glu Asp
 850 855 860
 Tyr Asn Leu Phe His Asn Val Val Pro Val Tyr Ile Arg Glu Gly Ala
 865 870 875 880
 Ile Ile Pro Gln Ile Gln Val Arg Gln Trp Ile Gly Glu Gly Pro
 885 890 895
 Asn Pro Ile Lys Phe Asn Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Lys Glu Tyr Val
 900 905 910
 Thr Tyr Leu Asp Asp Gly Val Ser Arg Asp Ser Ala Pro Asp Asp Leu
 915 920 925
 Pro Gln Tyr Arg Glu Ala Tyr Glu Gln Ala Lys Val Glu Gly Lys Asp
 930 935 940
 Val Gln Lys Gln Leu Ala Val Ile Gln Gly Asn Lys Thr Asn Asp Phe
 945 950 955 960
 Ser Ala Ser Gly Ile Asp Lys Glu Ala Lys Gly Tyr His Arg Lys Val
 965 970 975
 Ser Ile Lys Gln Glu Ser Lys Asp Lys Thr Arg Thr Val Thr Ile Glu
 980 985 990
 Pro Lys His Asn Gly Tyr Asp Pro Ser Lys Glu Val Glu Asn Tyr Tyr
 995 1000 1005
 Thr Ile Ile Leu Trp Tyr Ala Pro Gly Phe Asp Gly Ser Ile Val Asp
 1010 1015 1020

Val Ser Gln Ala Thr Val Asn Ile Glu Gly Gly Val Glu Cys Glu Ile
 1025 1030 1035 1040

Phe Lys Asn Thr Gly Leu His Thr Val Val Val Asn Val Lys Glu Val
 1045 1050 1055

Ile Gly Thr Thr Lys Ser Val Lys Ile Thr Cys Thr Thr Ala
 1060 1065 1070

(2)配列番号7の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 3201塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 二本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: DNA (genomic)

(xi)配列: 配列番号7:

| | |
|---|------|
| ATGGCAGGAT TTTCTGATCC TCTCAACTTT TGCAAAGCAG AAGACTACTA CAGTGTTGCG | 60 |
| CTAGACTGGA AGGGCCCTCA AAAAACATT GGAGTAGACA CTACTCCTCC AAAGAGCACC | 120 |
| AAGTCCCCA AAAACTGGCA TGGAGTGAAC TTGAGATTG ATGATGGGAC TTTAGGTGTG | 180 |
| GTTCAAGTTCA TTAGGCCGTG CGTTGGAGG GTTAGATAACG ACCCTGGTTT CAAGACCTCT | 240 |
| GACGAGTATG GTGATGAGAA TACGAGGACA ATTGTGCAAG ATTATATGAG TACTCTGAGT | 300 |
| AATAAATTGG ATACTTATAG AGGTCTTACG TGGGAAACCA AGTGTGAGGA TTCGGGAGAT | 360 |
| TTCTTACCT TCTCATCCAA GGTACCCGCC GTTGAAAAT CCGAGCGGAC CCGCAACAAG | 420 |
| GTCGGCGATG GCCTCAGAAT TCACCTATGG AAAAGCCCTT TCCGCATCCA AGTAGTGCAC | 480 |
| ACCTTGACCC CTTTGAAGGA TCCTTACCCC ATTCAAATG TAGCCGCAGC CGAAGCCCGT | 540 |
| GTGTCCGACA AGGTCTTGC GCAAACGTCT CCCAAGACAT TCAGAAAGAA CCTGCATCCG | 600 |
| CAACACAAGA TGCTAAAGGA TACAGTTCTT GACATTGTCA AACCTGGACA TGGCGAGTAT | 660 |
| GTGGGGTGGG GAGAGATGGG AGGTATCCAG TTTATGAAGG AGCCAACATT CATGAACAT | 720 |
| TTTAACCTCG ACAATATGCA ATACCAAGCAA GTCTATGCC AAGGTGCTCT CGATTCTCGC | 780 |
| GAGCCACTGT ACCACTCGGA TCCCTTCTAT CTTGATGTGA ACTCCAACCC GGAGCACAAG | 840 |
| AATATCACGG CAACCTTAT CGATAACTAC TCTCAAATTG CCATCGACTT TGGAAAGACC | 900 |
| AACTCAAGGCT ACATCAAGCT GGGAACCAAGG TATGGTGGTA TCGATTGTTA CGGTATCAGT | 960 |
| GCGGATAACGG TCCCGGAAAT TGTACGACTT TATACAGGTC TTGTTGGACG TTCAAAGTTG | 1020 |

| | |
|---|------|
| AAGCCCAGAT ATATTCTCGG GGCCCATCAA GCCTGTTATG GATAACCAACA GGAAAGTGAC | 1080 |
| TTGTATTCTG TGGTCCAGCA GTACCGTGAC TGTAATTC CACTTGACGG GATTCACGTC | 1140 |
| GATGTCGATG TTCAGGACGG CTTCAGAACT TTCACCACCA ACCCACACAC TTTCCCTAAC | 1200 |
| CCCAAAGAGA TGTTTACTAA CTTGAGGAAT AATGGAATCA AGTGCTCCAC CAATATCACT | 1260 |
| CCTGTTATCA GCATTAACAA CAGAGAGGGT GGATACAGTA CCCTCCTGAA GGGAGTTGAC | 1320 |
| AAAAAAACT TTATCATGGA CGACAGATAT ACCGAGGGAA CAAGTGGGAA TGCGAAGGAT | 1380 |
| GTTCGGTACA TGTAATACGG TGGTGGTAAT AAGGTTGAGG TCGATCCTAA TGATGTTAAT | 1440 |
| GGTCGGCCAG ACTTTAAAGA CAACTATGAC TTCCCCGCGA ACTTCAACAG CAAACAATAC | 1500 |
| CCCTATCATG GTGGTGTGAG CTACGGTTAT GGGAACGGTA GTGCAGGTTT TTACCCGGAC | 1560 |
| CTCAACAGAA AGGAGGTTCG TATCTGGTGG GGAATGCAGT ACAAGTATCT CTTCGATATG | 1620 |
| GGACTGGAAT TTGTGTGGCA AGACATGACT ACCCCAGCAA TCCACACATC ATATGGAGAC | 1680 |
| ATGAAAGGGT TGCCCACCCG TCTACTCGTC ACCTCAGACT CCGTCACCAA TGCCTCTGAG | 1740 |
| AAAAAGCTCG CAATTGAAAC TTGGGCTCTC TACTCCTACA ATCTCCACAA AGCAACTTGG | 1800 |
| CATGGTCTTA GTCGTCTCGA ATCTCGTAAG AACAAACGAA ACTTCATCCT CGGGCGTGG | 1860 |
| AGTTATGCCG GAGCCTATCG TTTTGCTGGT CTCTGGACTG GGGATAATGC AAGTAACTGG | 1920 |
| GAATTCTGGA AGATATCGGT CTCTCAAGTT CTTTCTCTGG GCCTCAATGG TGTGTGCATC | 1980 |
| GCGGGGTCTG ATACGGGTGG TTTTGAACCC TACCGTGATG CAAATGGGGT CGAGGGAGAAA | 2040 |
| TACTGTAGCC CAGAGCTACT CATCAGGTGG TATACTGGTT CATTCTCTT GCCGTGGCTC | 2100 |
| AGGAACCATT ATGTCAAAAA GGACAGGAAA TGGTTCCAGG AACCATACAC GTACCCCAAG | 2160 |
| CATCTTGAAA CCCATCCAGA ACTCGCAGAC CAAGCATGGC TCTATAAATC CGTTTTGGAG | 2220 |
| ATCTGTAGGT ACTATGTGGA GCTTAGATAC TCCCTCATCC AACTACTTTA CGACTGCATG | 2280 |
| TTTCAAAACG TAGTCGACGG TATGCCAATC ACCAGATCTA TGCTCTTGAC CGATACTGAG | 2340 |
| GATACCACCT TCTTCAACGA GAGCCAAAAG TTCCCTCGACA ACCAATATAT GGCTGGTGAC | 2400 |
| GACATTCTTG TTGCACCCAT CCTCCACAGT CGCAAAGAAA TTCCAGGCGA AAACAGAGAT | 2460 |
| GTCTATCTCC CTCTTACCA CACCTGGTAC CCCTCAAATT TGAGACCATG GGACGATCAA | 2520 |
| GGAGTCGCTT TGGGGAAATCC TGTCGAAGGT GGTAGTGTCA TCAATTATAC TGCTAGGATT | 2580 |
| GTTGCACCCG AGGATTATAA TCTCTTCCAC AGCGTGGTAC CAGTCTACGT TAGAGAGGGT | 2640 |
| <u>GCCATCATCC CGCAAATCGA AGTACGCCAA TGGACTGGCC AGGGGGGAGC CAACCGC</u> ATC | 2700 |

| | |
|--|------|
| AAGTTCAACA TCTACCCCTGG AAAGGATAAG GAGTACTGTA CCTATCTTGA TGATGGTGTT | 2760 |
| AGCCGTGATA GTGCCGCCGGA AGACCTCCCAGTACAAAG AGACCCACGA ACAGTCGAAG | 2820 |
| GTTGAAGGCG CGGAAATCGC AAAGCAGATT GGAAAGAAGA CGGGTTACAA CATCTCAGGA | 2880 |
| ACCGACCCAG AAGCAAAGGG TTATCACCGC AAAGTTGCTG TCACACAAAC GTCAAAAGAC | 2940 |
| AAGACGCGTA CTGTCACTAT TGAGCCAAAA CACAATGGAT ACGACCCCTTC CAAAGAGGTG | 3000 |
| GGTGATTATT ATACCATCAT TCTTTGGTAC GCACCAGGTT TCGATGGCAG CATCGTCGAT | 3060 |
| GTGAGCAAGA CGACTGTGAA TGTTGAGGGT GGGGTGGAGC ACCAAGTTA TAAGAACTCG | 3120 |
| GATTTACATA CGGTTGTTAT CGACGTGAAG GAGGTGATCG GTACCACAAA GAGCGTCAAG | 3180 |
| ATCACATGTA CTGCCGCTTA A | 3201 |

(2)配列番号 8 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 3213塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 二本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : DNA (genomic)

(xi)配列 : 配列番号 8 :

| | |
|--|-----|
| ATGGCAGGAT TATCCGACCC TCTCAATTTC TGCAAAGCAG AGGACTACTA CGCTGCTGCC | 60 |
| AAAGGCTGGA GTGGCCCTCA GAAGATCATT CGCTATGACC AGACCCCTCC TCAGGGTACA | 120 |
| AAAGATCCGA AAAGCTGGCA TGCCTGAAAC CTTCTTTCG ATGACGGGAC TATGTGTGTA | 180 |
| GTGCAATTG TGAGACCCCTG TGTTTGGAGG GTTAGATATG ACCCCAGTGT CAAGACTTCT | 240 |
| GATGAGTACG GCGATGAGAA TACGAGGACT ATTGTACAAG ACTACATGAC TACTCTGGTT | 300 |
| GGAAACTTGG ACATTTTCAG AGGTCTTACG TGGGTTCTA CGTTGGAGGA TTCGGGGAG | 360 |
| TACTACACCT TCAAGTCCGA AGTCACTGCC GTGGACGAAA CCGAACGGAC TCGAAACAAG | 420 |
| GTCGGCGACG GCCTCAAGAT TTACCTATGG AAAAATCCCT TTGCGATCCA GGTAGTGCCT | 480 |
| CTCTTGACCC CCCTGGTGGGA CCCTTCCCC ATTCCCAACG TAGCCAATGC CACAGCCGT | 540 |
| GTGGCCGACA AGGTTGTTTG GCAGACGTCC CCGAAGACGT TCAGGAAAAA CTTGCGATCCG | 600 |
| CAGCATAAGA TGTTGAAGGA TACAGTTCTT GATATTATCA AGCCGGGGCA CGGAGAGTAT | 660 |
| GTGGGTTGGG GAGAGATGGG AGGCATCGAG TTTATGAAGG AGCCAACATT CATGAATTAT | 720 |

| | |
|---|------|
| TTCAACTTTG ACAATATGCA ATATCAGCAG GTCTATGCAC AAGGCCTCT TGATAGTCGT | 780 |
| GAGCCGTTGT ATCACTCTGA TCCCTTCTAT CTCGACGTGA ACTCCAACCC AGAGCACAAG | 840 |
| AACATTACGG CAACCTTAT CGATAACTAC TCTCAGATTG CCATCGACTT TGGGAAGACC | 900 |
| AACTCAGGCT ACATCAAGCT GGGTACCAAGG TATGGCGGTA TCGATTGTTA CGGTATCAGC | 960 |
| GCGGATACGG TCCCAGGAGAT TGTGCGACTT TATACTGGAC TTGTTGGCG TTCGAAGTTG | 1020 |
| AAGCCCAGGT ATATTCTCGG AGCCCACCAA GCTTGTATG GATACCAGCA GGAAAGTGAC | 1080 |
| TTGCATGCTG TTGTTCAGCA GTACCGTGAC ACCAAGTTG CGCTTGATGG GTTGCATGTC | 1140 |
| GATGTCGACT TTCAGGACAA TTTCAGAACG TTTACCACTA ACCCGATTAC GTTCCCTAAT | 1200 |
| CCCAAAGAAA TGTTTACCAA TCTAAGGAAC AATGGAATCA AGTGTCCAC CAACATCACC | 1260 |
| CCTGTTATCA GTATCAGAGA TCGCCCGAAT GGGTACAGTA CCCTCAATGA GGGATATGAT | 1320 |
| AAAAAGTACT TCATCATGGA TGACAGATAT ACCGAGGGGA CAAGTGGGGAA CCCGAAAAT | 1380 |
| GTTCGATACT CTTTTACGG CGGTGGGAAC CCGGTTGAGG TTAACCCCTAA TGATGTTGG | 1440 |
| GCTCGGCCAG ACTTTGGAGA CAATTATGAC TTCCCTACGA ACTTCAACTG CAAAGACTAC | 1500 |
| CCCTATCATG GTGGTGTGAG TTACGGATAT GGGAAATGGCA CTCCAGGTTA CTACCCCTGAC | 1560 |
| CTTAACAGAG AGGAGGTTG TATCTGGTGG GGATTGCAGT ACGAGTATCT CTTCAATATG | 1620 |
| GGACTAGAGT TTGTATGGCA AGATATGACA ACCCCAGGGA TCCATTCAATC ATATGGAGAC | 1680 |
| ATGAAAGGGT TGCCCACCCG TCTGCTCGTC ACCGCCGACT CAGTTACCAA TGCCTCTGAG | 1740 |
| AAAAAGCTCG CAATTGAAAG TTGGGCTCTT TACTCCTACA ACCTCCATAA AGCAACCTTC | 1800 |
| CACGGCTTG GTCGTCTTGA GTCTCGTAAG AACAAACGTA ACTTCATCCT CGGACGTGGT | 1860 |
| AGTTACGCCG GTGCCATCG TTTTGCTGGT CTCTGGACTG GAGATAACGC AAGTACGTGG | 1920 |
| GAATTCTGGA AGATTCGGT CTCCCAAGTT CTTTCTCTAG GTCTCAATGG TGTGTGTATA | 1980 |
| GCGGGGTCTG ATACGGGTGG TTTTGAGCCC GCACGTACTG AGATTGGGGGA GGAGAAATAT | 2040 |
| TGCAGTCCGG AGCTACTCAT CAGGTGGTAT ACTGGATCAT TCCTTTGCC ATGGCTTAGA | 2100 |
| AACCACTACG TCAAGAAGGA CAGGAAATGG TTCCAGGAAC CATAACGCGTA CCCCAAGCAT | 2160 |
| CTTGAAACCC ATCCAGAGCT CGCAGATCAA GCATGGCTTT ACAAAATCTGT TCTAGAAATT | 2220 |
| TGCAGATACT GGGTAGAGCT AAGATATTCC CTCATCCAGC TCCTTTACGA CTGCATGTTG | 2280 |
| CAAAACGTGG TCGATGGTAT GCCACTTGCC AGATCTATGC TCTTGACCGA TACTGAGGAT | 2340 |
| ACGACCTTCT TCAATGAGAG CCAAAAGTTC CTCGATAACC AATATATGGC TGGTGACGAC | 2400 |

| | |
|--|------|
| ATCCTTGTAG CACCCATCCT CCACAGCCGT AACGAGGTTC CGGGAGAGAA CAGAGATGTC | 2460 |
| TATCTCCCTC TATTCCACAC CTGGTACCCC TCAAAC TTGA GACCGTGGGA CGATCAGGGA | 2520 |
| GTCGCTTTAG GGAATCCTGT CGAAGGTGGC AGCGTTATCA ACTACACTGC CAGGATTGTT | 2580 |
| GCCCCAGAGG ATTATAATCT CTTCCACAAC GTGGTGCCGG TCTACATCAG AGAGGGTGCC | 2640 |
| ATCATTCCGC AAATTCAAGGT ACGCCAGTGG ATTGGCGAAG GAGGGCCTAA TCCCATCAAG | 2700 |
| TTCAATATCT ACCCTGGAAA GGACAAGGAG TATGTGACGT ACCTTGATGA TGGTGTTAGC | 2760 |
| CGCGATAGTG CACCAAGATGA CCTCCCGCAG TACCGCGAGG CCTATGAGCA AGCGAAGGTC | 2820 |
| GAAGGCCAAAG ACGTCCAGAA GCAACTTGCG GTCATTCAAG GGAATAAGAC TAATGACTTC | 2880 |
| TCCGCCTCCG GGATTGATAA GGAGGCCAAAG GGTTATCACC GCAAAGTTTC TATCAAACAG | 2940 |
| GAGTCAAAAG ACAAGACCCG TACTGTCAAC ATTGAGCCAA AACACAACGG ATACGACCCC | 3000 |
| TCTAAGGAAG TTGGTAATTA TTATACCATC ATTCTTTGGT ACGCACCGGG CTTTGACGGC | 3060 |
| AGCATCGTCG ATGTGAGCCA GGCGACCGTG AACATCGAGG GCAGGGGTGGA ATGCGAAATT | 3120 |
| TTCAAGAACCA CCGGCTTGCA TACGGTTGTA GTCAACGTGA AAGAGGTGAT CGGTACCACA | 3180 |
| AAGTCCGTCA AGATCACTTG CACTACCGCT TAG | 3213 |

(2)配列番号 9 の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 317アミノ酸
- (B)型 : アミノ酸
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : ペプチド

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : Modified-site
- (B)存在位置 : 201
- (D)他の情報 : ／記 = "Xはmisc. アミノ酸を表す"

(xi)配列 : 配列番号 9 :

| | | | |
|---|----|----|----|
| Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Pro Asp Leu | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ile Pro Pro Gly His Asp Ser Asp Pro Asp Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Phe Ala Ala Pro Trp Val Ile Ala His Gly Tyr Arg Gly Thr Ser Asp | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Leu Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Thr
 50 55 60

Asn Thr Gly Asp Asp Ala Trp Ala Gly Gln Lys Asp Leu Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Gly Ala Gln Cys Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Glu Ala Gly
 85 90 95

Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Thr Ala Phe Ser Tyr Leu Gln Gly Lys
 100 105 110

Glu Tyr Glu Asn Gln Gly Leu Asn Ile Arg Ser Ala Met Pro Pro Lys
 115 120 125

Tyr Val Phe Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Ala Thr Ser Leu Leu
 130 135 140

Arg Asp Asn Leu Pro Ala Gly Glu Asn Asn Val Ser Leu Glu Glu Ile
 145 150 155 160

Val Glu Gly Tyr Gln Asn Gln Asn Val Pro Phe Glu Gly Leu Ala Val
 165 170 175

Asp Val Asp Met Gln Asp Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr Arg Pro Ala
 180 185 190

Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Xaa Gly Gly Asp Pro Asn Asn Lys
 195 200 205

Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Arg Gly Leu Val Cys Gln Thr Asn
 210 215 220

Val Thr Cys Phe Leu Lys Asn Glu Lys Asn Pro Tyr Glu Val Asn Gln
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Glu Lys Gln Leu Tyr Thr Lys Ser Asp Ser Leu Asp Asn
 245 250 255

Ile Asp Phe Gly Thr Thr Pro Asp Gly Pro Ser Asp Ala Tyr Ile Gly
 260 265 270

His Leu Asp Tyr Gly Gly Val Glu Cys Asp Ala Leu Phe Pro Asp
 275 280 285

Trp Gly Arg Pro Asp Val Ala Gln Trp Trp Gly Asp Asn Tyr Lys Lys
 290 295 300

Leu Phe Ser Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln Asp Met
 305 310 315

(2)配列番号10の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：323アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：Modified-site
- (B)存在位置：272
- (D)他の情報：／記=“Xはmisc. アミノ酸である”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：Modified-site
- (B)存在位置：273
- (D)他の情報：／記=“Xはmisc. アミノ酸である”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：Modified-site
- (B)存在位置：274
- (D)他の情報：／記=“Xはmisc. アミノ酸である”

(xi)配列：配列番号10：

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Thr | Asn | Tyr | Asn | Tyr | Asp | Asn | Tyr | Asn | Gln | Ser | Asp | Leu | | |
| 1 | | | | | | | | | 10 | | | | 15 | | |
| Ile | Ala | Pro | Gly | Tyr | Pro | Ser | Asp | Pro | Asn | Phe | Tyr | Ile | Pro | Met | Tyr |
| | | | | | | | | | | | | 20 | 25 | | 30 |
| Phe | Ala | Ala | Pro | Trp | Val | Val | Lys | Gly | Cys | Ser | Gly | Asn | Ser | Asp | |
| | | | | | | | | | | | | 35 | 40 | 45 | |
| Glu | Gln | Tyr | Ser | Tyr | Gly | Trp | Phe | Met | Asp | Asn | Val | Ser | Gln | Thr | Tyr |
| | | | | | | | | 50 | | | 55 | | 60 | | |
| Met | Asn | Thr | Gly | Gly | Thr | Ser | Trp | Asn | Cys | Gly | Glu | Glu | Asn | Leu | Ala |
| | | | | | | | | 65 | | | 70 | | 75 | | 80 |
| Tyr | Met | Gly | Ala | Gln | Cys | Gly | Pro | Phe | Asp | Gln | His | Phe | Val | Tyr | Gly |
| | | | | | | | | 85 | | | 90 | | | 95 | |
| Asp | Gly | Asp | Gly | Leu | Glu | Asp | Val | Val | Gln | Ala | Phe | Ser | Leu | Leu | Gln |
| | | | | | | | | 100 | | | 105 | | | 110 | |
| Gly | Lys | Glu | Phe | Glu | Asn | Gln | Val | Leu | Asn | Lys | Arg | Ala | Val | Met | Pro |
| | | | | | | | | 115 | | | 120 | | | 125 | |
| Pro | Lys | Tyr | Val | Phe | Gly | Tyr | Phe | Gln | Gly | Val | Phe | Gly | Ile | Ala | Ser |
| | | | | | | | | 130 | | | 135 | | | 140 | |

Leu Leu Arg Glu Gln Arg Pro Glu Gly Gly Asn Asn Ile Ser Val Ser
 145 150 155 160
 Glu Ile Val Glu Gly Tyr Gln Ser Asn Asn Phe Pro Leu Glu Gly Leu
 165 170 175
 Ala Val Asp Val Asp Met Gln Gln Asp Leu Arg Cys Ser Ser Pro Leu
 180 185 190
 Lys Ile Glu Phe Trp Thr Ala Asn Lys Val Gly Thr Gly Gly Asp Ser
 195 200 205
 Asn Asn Lys Ser Val Phe Glu Trp Ala His Asp Lys Gly Leu Val Cys
 210 215 220
 Gln Thr Asn Val Thr Cys Phe Leu Arg Asn Asp Asn Gly Gly Ala Asp
 225 230 235 240
 Tyr Glu Val Asn Gln Thr Leu Arg Glu Lys Gly Leu Tyr Thr Lys Asn
 245 250 255
 Asp Ser Leu Thr Asn Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Asp Gly Pro Xaa
 260 265 270
 Xaa Xaa Tyr Ile Gly His Leu Asp Tyr Gly Gly Gly Asn Cys Asp
 275 280 285
 Ala Leu Phe Pro Asp Trp Gly Arg Pro Gly Val Ala Glu Trp Trp Gly
 290 295 300
 Asp Asn Tyr Ser Lys Leu Phe Lys Ile Gly Leu Asp Phe Val Trp Gln
 305 310 315 320
 Asp Met Thr

(2)配列番号11の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：202アミノ酸
- (B)型：アミノ酸
- (C)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：Modified-site
- (B)存在位置：43
- (D)他の情報：／記=“Xはmisc. アミノ酸である”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：Modified-site
- (B)存在位置：176
- (D)他の情報：／記=“Xはmisc. アミノ酸である”

(xi)配列：配列番号11：

Met Thr Asn Tyr Asn Tyr Asp Asn Leu Asn Tyr Asn Gln Pro Asp Val
 1 5 10 15

Val Pro Pro Gly Tyr His Asp His Pro Asn Tyr Tyr Ile Pro Met Tyr
 20 25 30

Tyr Ala Ala Pro Trp Leu Val Val Gln Gly Xaa Ala Gly Thr Ser Lys
 35 40 45

Gln Tyr Ser Tyr Gly Trp Phe Met Asp Asn Val Ser Gln Ser Tyr Met
 50 55 60

Asn Thr Gly Asp Thr Ala Trp Asn Cys Gly Gln Glu Asn Leu Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gly Ala Gln Tyr Gly Pro Phe Asp Gln His Phe Val Tyr Gly Asp
 85 90 95

Gly Asp Gly Leu Glu Asp Val Val Lys Ala Phe Ser Phe Leu Gln Gly
 100 105 110

Lys Glu Phe Glu Asp Lys Lys Leu Asn Lys Arg Ser Val Met Pro Pro
 115 120 125

Lys Tyr Val Phe Gly Phe Phe Gln Gly Val Phe Gly Ala Leu Ser Leu
 130 135 140

Leu Lys Gln Asn Leu Pro Ala Gly Glu Asn Asn Ile Ser Val Gln Glu
 145 150 155 160

Ile Val Glu Gly Tyr Gln Asp Asn Asp Tyr Pro Phe Glu Gly Leu Xaa
 165 170 175

Val Asp Val Asp Met Gln Asp Asp Leu Arg Val Phe Thr Thr Lys Pro
 180 185 190

Glu Tyr Trp Ser Ala Asn Met Val Gly Glu
 195 200

(2)配列番号12の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：953塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (573, "")
- (D)他の情報：／記=“gはmisc. 核酸である”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference

(B)存在位置：置換 (601, "")
(D)他の情報：／記=“gはmisc. 核酸である”

(xi)配列：配列番号12：

| | |
|---|-----|
| ATGACAAACT ATAATTATGA CAATTGAAAC TACAATCAAC CGGACCTCAT CCCACCTGGC | 60 |
| CATGATTCAAG ATCCTGACTA CTATATTCCG ATGTACTTTG CGGCACCATG GGTGATCGCA | 120 |
| CATGGATATC GTGGCACCAAG CGACCAAGTAC TCTTATGGAT GGTTTTGGGA CAATGTATCC | 180 |
| CAGTCCTACA CAAACACTGG CGATGATGCA TGGGCTGGTC AGAAGGATTG GGCATACATG | 240 |
| GGGGCACAAAT GTGGGCCTTT CGATCAACAT TTGTGTATG AGGCTGGAGA TGGACTTGAA | 300 |
| GACGTTGTGA CCGCATTCTC TTATTTGCAA GGCAAGGAAT ATGAGAACCA GGGACTGAAT | 360 |
| ATACGTTCTG CAATGCCTCC GAAGTACGTT TTCGGATTTT TCCAAGGCCT ATTGGAGGCC | 420 |
| ACATCGCTGC TAAGGGACAA CTTACCTGCC GGCGAGAACACGCTCTTT GGAAGAAATT | 480 |
| GTTGAAGGAT ATCAAAATCA GAACGTGCCA TTTGAAGGTC TTGCTGTGGA TGTTGATATG | 540 |
| CAAGATGACT TGAGAGTGT CACTACGAGA CCGGCGTTTT GGACGGCAAA CAAGGTGGGG | 600 |
| GAAGGCCGTG ATCCAAACAA CAAGTCAGTG TTTGAGTGGG CACATGACAG GGGCCTTGTC | 660 |
| TGCCAGACGA ATGTAACCTG CTTCTTGAAG AACGAGAAAA ATCCTTACGA AGTGAATCAG | 720 |
| TCATTGAGGG AGAACGAGTT GTATACGAAG AGTGATTCCCT TGGACAACAT TGATTTGGAA | 780 |
| ACTACTCCAG ATGGGCCTAG CGATGCGTAC ATTGGACACT TAGACTACGG TGGTGGTGTG | 840 |
| GAGTGTGATG CACTATTCCC AGACTGGGT CGACCAAGACG TGGCTCAATG GTGGGGCGAT | 900 |
| AACTACAAGA AACTATTCAAG CATTGGTCTC GACTTCGTAT GGCAAGACAT GAC | 953 |

(2)配列番号13の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：969塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：二本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：
(A)特徴を表す記号：misc_difference
(B)存在位置：置換 (814..821, "")
(D)他の情報：／記=“814と812の間（およびそれらを含む）それぞれのgは misc. 核酸である”

(xi)配列：配列番号13：

| | |
|--|-----|
| ATGACAAACT ACAACTACGA CAACTATAAC TACAACCAGT CAGATCTTAT TGCTCCAGGA | 60 |
| TATCCTTCGG ACCCGAACCTT CTACATTCCC ATGTATTTG CAGCACCTTG GGTAGTTGTT | 120 |
| AAGGGATGCA GTGGCAACAG CGATGAACAG TACTCGTACG GATGGTTAT GGATAATGTC | 180 |
| TCCCCAAACTT ACATGAATAC TGGTGGTACT TCCTGGAAC GTGGAGAGGA GAACTTGGCA | 240 |
| TACATGGGAG CACAGTGCAG TCCATTGAC CAACATTTG TGTATGGTGA TGGAGATGGT | 300 |
| CTTGAGGATG TTGTCCAAGC GTTCTCTCTT CTGCAAGGCA AAGAGTTTGA GAACCAAGTT | 360 |
| CTGAACAAAC GTGCCGTAAT GCCTCCGAAA TATGTGTTG GTTACTTTCA GGGAGTCTTT | 420 |
| GGGATTGCTT CCTTGTTGAG AGAGCAAAGA CCAGAGGGTG GTAATAACAT CTCTGTTCA | 480 |
| GAGATTGTCG AAGGTTACCA AAGCAATAAC TTCCCTTAG AGGGGTTAGC CGTAGATGTG | 540 |
| GATATGCAAC AAGATTTGCG GTGTAGTTCA CCACTGAAGA TTGAATTTG GACGGCAAAT | 600 |
| AAGGTAGGCA CCGGGGGAGA CTCGAATAAC AAGTCGGTGT TTGAATGGGC ACATGACAAA | 660 |
| GGCCTTGTAT GTCAGACGAA TGTTACTTGC TTCTTGAGAA ACGACAACGG CGGGGCAGAT | 720 |
| TACGAAGTCA ATCAGACATT GAGGGAGAAG GGTTTGTACA CGAAGAATGA CTCACTGACG | 780 |
| AACACTAACT TCGGAACTAC CAACGACGGG CCGGGGGGGGG GGTACATTGG ACATCTGGAC | 840 |
| TATGGTGGCG GAGGGAAATTG TGATGCACTT TTCCCAGATT GGGGTCGACC GGGTGTGGCT | 900 |
| GAATGGTGGG GTGATAACTA CAGCAAGCTC TTCAAAATTG GTCTGGACTT CGTGTGGCAA | 960 |
| GATATGACA | 969 |

(2)配列番号14の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：607塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (128, "")
- (D)他の情報：／記 = “gはmisc. 核酸である”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (232, "")
- (D)他の情報：／記 = “gはmisc. 核酸である”

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (249, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "gはmisc. 核酸である"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (526, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "gはmisc. 核酸である"

(xi)配列 : 配列番号14 :

| | |
|---|-----|
| ATGACAAACT ACAATTACGA CAACTTGAAC TACAACCAAC CAGACGTCGT TCCTCCAGGT | 60 |
| TATCACGACC ATCCCCACTA CTACATTCCA ATGTACTACG CAGCACCGTG GTTGGTCGTT | 120 |
| CAGGGATGCG CGGGGACATC GAAGCAATAAC TCGTACGGTT GGTTTATGGA CAATGTCTCT | 180 |
| CAGTCGTACA TGAACACTGG AGATACGGCG TGGAACCTGCG GACAGGAAAA CGTGGCATAAC | 240 |
| ATGGGCGCGC AATAACGGGCC ATTTGATCAG CACTTTGTGT ATGGTGTGAG AGATGGCCTT | 300 |
| GAAGATGTCG TCAAAGCGTT CTCCCTTCTT CAAGGAAAGG AGTTGAAAGA CAAAAAAACTC | 360 |
| AACAAGCGTT CTGTAATGCC TCCGAAGTAC GTGTTGGTT TCTTCCAGGG TGTTTTCGGT | 420 |
| GCACTTTCAC TGTTGAAGCA GAATCTGCCT GCCGGAGAGA ACAACATCTC AGTGCAAGAG | 480 |
| ATTGTGGAGG GTTACCAAGGA TAACGACTAC CCCTTGAAAG GGCTCGCGGT AGATGTTGAT | 540 |
| ATGCAAGATG ATCTGCGAGT GTTACTACC AAACCAGAAT ATTGGTCGGC AACATGGTA | 600 |
| GGCGAAG | 607 |

(2)配列番号15の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 90アミノ酸
- (B)型 : アミノ酸
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : ペプチド

(xi)配列 : 配列番号15 :

| | | | |
|---|----|----|----|
| Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 |
| Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asn Asn Asp Ser | | | |
| 20 | 25 | 30 | |
| Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp | | | |
| 35 | 40 | 45 | |

Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Ser Thr Glu
 50 55 60

Arg Glu Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Gln Trp Tyr Lys Phe Gly Pro
 65 70 75 80

Asp Phe Asp Thr Lys Pro Leu Glu Gly Ala
 85 90

(2)配列番号16の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA^(genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号16：

ATGTANAANA ANGANTCNAAA NGT

23

(2)配列番号17の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記= “NはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号17：

ATGTANAANA ANGANAGNAAA NGT

23

(2)配列番号18の情報：

- (i)配列の特色：
- (A)長さ：17塩基対
 - (B)型：核酸
 - (C)鎖の数：一本鎖
 - (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference
 - (B)存在位置：置換 (3, "")
 - (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference
 - (B)存在位置：置換 (6, "")
 - (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference
 - (B)存在位置：置換 (9, "")
 - (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference
 - (B)存在位置：置換 (12, "")
 - (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference
 - (B)存在位置：置換 (15, "")
 - (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(xi)配列：配列番号18：

TANCCNTCNT GNCCCNCC

17

(2)配列番号19の情報：

- (i)配列の特色：
- (A)長さ：20塩基対
 - (B)型：核酸
 - (C)鎖の数：一本鎖
 - (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

- (ix)配列の特徴：
- (A)特徴を表す記号：misc_difference

(B)存在位置：置換 (3, "")
 (D)他の情報：／記= “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記= “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記= “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記= “NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号19：

GGNCCNAANT TNTACCANTG

20

(2)配列番号20の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：17塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (3, "")
- (D)他の情報：／記= “NはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記= “NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")

(D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

(xi)配列：配列番号20：

TANCGNTGGC ANGANGT

17

(2)配列番号21の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：17塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (3, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記 = “NはGまたはAである”

(xi)配列：配列番号21：

TANAGNTGGC ANGANGT

17

(2)配列番号22の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：71塩基対
- (B)型：核酸

(C)鎖の数：二本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号22：

| | |
|---|----|
| ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGCGGC | 60 |
| CACGACGGTT A | 71 |

(2)配列番号23の情報：

(i)配列の特色：
 (A)長さ：23アミノ酸
 (B)型：アミノ酸
 (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号23：

| | |
|---|--|
| Met Tyr Asn Asn Asp Ser Asn Val Arg Arg Ala Gln Asn Asp His Phe | |
| 1 5 10 15 | |
| Leu Leu Gly Gly His Asp Gly | |
| 20 | |

(2)配列番号24の情報：

(i)配列の特色：
 (A)長さ：160塩基対
 (B)型：核酸
 (C)鎖の数：二本鎖
 (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号24：

| | |
|---|-----|
| ATGTACAACA ACGACTCGAA CGTTCGCAGG GCGCAGAACG ATCATTTCCT TCTTGGTGGA | 60 |
| CATGATGGAT ATCGCATTCT GTGCGCGCCT GTTGTGTGGG AGAATTGAC CGAACGGAAAT | 120 |
| TGTACTTGCC CGTGCTGACC CAATGGTACA AATTGGGCC | 160 |

(2)配列番号25の情報：

(i)配列の特色：
 (A)長さ：54アミノ酸

(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号25：

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Tyr | Asn | Asn | Asp | Ser | Asn | Val | Arg | Arg | Ala | Gln | Asn | Asp | His | Phe |
| 1 | | | | | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Leu | Leu | Gly | Gly | His | Asp | Gly | Tyr | Arg | Ile | Leu | Cys | Ala | Pro | Val | Val |
| | | | | | | | | 25 | | | | | | 30 | |
| Trp | Glu | Asn | Ser | Thr | Glu | Arg | Glu | Leu | Tyr | Leu | Pro | Val | Leu | Thr | Gln |
| | 35 | | | | 40 | | | | | | | | 45 | | |
| Trp | Tyr | Lys | Phe | Gly | Pro | | | | | | | | | | |
| | | | | | 50 | | | | | | | | | | |

(2)配列番号26の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：238塩基対
(B)型：核酸
(C)鎖の数：二本鎖
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号26：

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| TACAGGTGGC | AGGAGGTGTT | GTACACTGCT | ATGTACCAGA | ATGCGGCTTT | CGGGAAACCG | 60 |
| ATTATCAAGG | CAGCTTCCAT | GTACGACAAC | GACAGAAACG | TTCGCGGCGC | ACAGGATGAC | 120 |
| CACTTCCTTC | TCGGCGGACA | CGATGGATAT | CGTATTTGT | GTGCACCTGT | TGTGTGGGAG | 180 |
| AATAACAACCA | GTCGCGATCT | GTACTTG CCT | GTGCTGACCA | GTGGTACAAA | TTCGGCCCC | 238 |

(2)配列番号27の情報：

(i)配列の特色：
(A)長さ：79アミノ酸
(B)型：アミノ酸
(D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：ペプチド

(xi)配列：配列番号27：

Tyr Arg Trp Gln Glu Val Leu Tyr Thr Ala Met Tyr Gln Asn Ala Ala
 1 5 10 15

Phe Gly Lys Pro Ile Ile Lys Ala Ala Ser Met Tyr Asp Asn Asp Arg
 20 25 30

Asn Val Arg Gly Ala Gln Asp Asp His Phe Leu Leu Gly Gly His Asp
 35 40 45

Gly Tyr Arg Ile Leu Cys Ala Pro Val Val Trp Glu Asn Thr Thr Ser
 50 55 60

Arg Asp Leu Tyr Leu Pro Val Leu Thr Lys Trp Tyr Lys Phe Gly
 65 70 75

(2)配列番号28の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：28塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(xi)配列：配列番号28：

GCTCTAGAGC ATGTTTCAA CCCTTGCG

28

(2)配列番号29の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：36塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：DNA (genomic)

(xi)配列：配列番号29：

AGCTTGTAA CATGTATCCA ACCCTCACCT TCGTGG

36

(2)配列番号30の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：34塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：二本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類: DNA (genomic)

(xi)配列: 配列番号30:

ACAAATTGTAC ATAGGTTGGG AGTGGAAAGCA CCGC

34

(2)配列番号31の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 75アミノ酸
- (B)型: アミノ酸
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: ペプチド

(xi)配列: 配列番号31:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Asn | Leu | His | Pro | Gln | His | Lys | Met | Leu | Lys | Asp | Thr | Val | Leu | Asp |
| 1 | | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |
| Ile | Val | Lys | Pro | Gly | His | Gly | Glu | Tyr | Val | Gly | Trp | Gly | Glu | Met | Gly |
| | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| Gly | Ile | Gln | Phe | Met | Lys | Glu | Pro | Thr | Phe | Met | Asn | Tyr | Phe | Asn | Phe |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| Asp | Asn | Met | Gln | Tyr | Gln | Gln | Val | Tyr | Ala | Gln | Gly | Ala | Leu | Asp | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | 60 | | | | | |
| Arg | Glu | Pro | Leu | Tyr | His | Ser | Asp | Pro | Phe | Tyr | | | | | |
| | 65 | | | | | 70 | | | 75 | | | | | | |

(2)配列番号32の情報:

(i)配列の特色:

- (A)長さ: 23塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii)配列の種類: cDNA

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc_difference
- (B)存在位置: 置換 (3, "")
- (D)他の情報: /記 = “NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴:

- (A)特徴を表す記号: misc_difference
- (B)存在位置: 置換 (6, "")

(D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号32：

CANCANAANA TGCTNAANGA NAC

23

(2)配列番号33の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (3, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (15, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (18, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (21, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号33：

CANCANAANA TGTTNAANGA NAC

23

(2)配列番号34の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：20塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (3, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (6, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (9, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換 (12, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (15, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (18, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAである"

(xi)配列 : 配列番号34 :

TANAANGGNT CNCTNTGNTA

20

(2)配列番号35の情報 :

(i)配列の特色 :

- (A)長さ : 20塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 一本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : cDNA

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (3, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (6, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (9, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (12, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (15, "")
- (D)他の情報 : ノ記 = "NはGまたはAである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (18, "")
- (D)他の情報 : /記 = "NはGまたはAである"

(xi)配列 : 配列番号35 :

TANAANGGNT CNGANTGNTA

20

(2)配列番号36の情報 :

- (i)配列の特色 :
- (A)長さ : 37塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 一本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : cDNA

(xi)配列 : 配列番号36 :

AAACTGCAGC TGGCGCGCCA TGGCAGGATT TTCTGAT

37

(2)配列番号37の情報 :

- (i)配列の特色 :
- (A)長さ : 23塩基対
- (B)型 : 核酸
- (C)鎖の数 : 一本鎖
- (D)トポロジー : 直鎖状

(ii)配列の種類 : cDNA

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (6, "")
- (D)他の情報 : /記 = "NはGまたはAまたはTまたはCである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (9, "")
- (D)他の情報 : /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (12, "")
- (D)他の情報 : /記 = "NはCまたはTである"

(ix)配列の特徴 :

- (A)特徴を表す記号 : misc_difference
- (B)存在位置 : 置換 (15, "")

(D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(18, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(21, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(xi)配列：配列番号37：

ATGACNAANT ANAANTANGA NAA

23

(2)配列番号38の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：21塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(1, "")
- (D)他の情報：／記=“NはAまたはGである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(4, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(13, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(16, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(19, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(xi)配列：配列番号38：

NTGNGGCATC ATNGCNGGNA C

21

(2)配列番号39の情報：

(i)配列の特色：

- (A)長さ：23塩基対
- (B)型：核酸
- (C)鎖の数：一本鎖
- (D)トポロジー：直鎖状

(ii)配列の種類：cDNA

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(6, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(9, "")
- (D)他の情報：／記=“NはCまたはTである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(15, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAまたはTまたはCである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(18, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(ix)配列の特徴：

- (A)特徴を表す記号：misc_difference
- (B)存在位置：置換(21, "")
- (D)他の情報：／記=“NはGまたはAである”

(xi)配列：配列番号39：

GTCATNTCNT GCCANACNAA NTC

23

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

| | |
|--|--|
| 寄託者の氏名および住所 デンマーク、コペンハーゲン、ティーケー1001、 ビーオービー-17、ランゲアムガード1. ダニエル・ハイテクノロジー | <u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した |
|--|--|

| | |
|--|--|
| I. 微生物の表示 | |
| 寄託者による識別ための表示 : 国際寄託当局により与えられた受託番号 : Esherichia coli DH5 α -pGL1 NCIMB 40652 | |
| II. 科学的性質および/または提示された分類学上の位置 : Iで表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける) | |
| III. 受託および受理 この国際寄託当局は、上記 I で表示される微生物を1994年6月20日 (原寄託の日付) ¹ に受け付けて受理している | |
| IV. 転換のための請求の受託 上記 I で表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換する要請は受理された。 | |
| V. 国際寄託当局 名称 : エヌ・アイ・エム・ビー・リミテッド 国際寄託当局の代表者 住所 : イギリス国 イーピー-2 ラルワイ または事務局長の署名 スコットランド アバディーン セント マチャードライツ 23 日付 : 1994年6月30日 | |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

生存に関する証明書の宛人 原寄託についての受託証
 の名称および住所 次の頁に記載されている
 デンマーク、コペンハーゲン、ティーケー1001、国際寄託当局が規則10.2に
 ピーオーピー-17、ラツカブルガート1。
 従って発行した
 ダニスコ バイオテクノロジー

| | |
|---|--|
| I. 寄託者 | II. 微生物の表示 |
| 名称：同上 | 国際寄託当局により与えられた 受託番号： NCIMB 40652 |
| 住所： | 寄託または移送の日付： 1994年6月20日 |
| III. 生存に関する証明 | |
| 上記 II に表示された微生物の生存を1994年6月22日に試験した | |
| ^{2.} この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> ^{3.} 生存していた <input type="checkbox"/> ^{3.} 生存していなかった | |

¹ 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、
関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。

² 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試
験のことを指す。

³ 該当する四角に×印を付ける。

| | |
|--|---|
| IV. 生存試験を行った条件 ⁴ | |
| | |
| V 国際寄託当局 | |
| 名称：エヌシーアイエムピー・リミテッド 住所：イギリス国 エビン-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチュー・ドライア 23 | 国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年6月30日 |

⁴ 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国 際 様 式

| | |
|--|--|
| 寄託者の氏名および住所 デソマーク、コヘンハーゲン ケー、ディーカー1001、 ビーオービー-17、ラシケアムガード1。 ケニスコ バイオテクノロジー | <u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した |
|--|--|

| | |
|---|---|
| I. 微生物の表示 | |
| 寄託者による識別のための表示： Escherichia coli DH5 α -pGL2 | |
| 国際寄託当局により与えられた受託番号： NCIMB 40653 | |
| II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置： | |
| Iで表示された微生物は以下を伴っていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける) | |
| III. 受託および受理 | |
| この国際寄託当局は、上記 Iで表示される微生物を1994年6月20日 (原寄託の日付) ¹ に受け付けて受理している | |
| IV. 転換のための請求の受託 | |
| 上記 Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付) および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された。 | |
| V. 国際寄託当局 | |
| 名称：エヌシーアイエムビーリミテッド 住所：イギリス国 イーピー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチャードライア 23 | 国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付：1994年6月30日 |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を
取得した日付となる。

特許手続上の

微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

生存に関する証明書の名宛人 原寄託についての受託証
の名称および住所 次の頁に記載されている
デンマーク、コペンハーゲン ケー、ティーカー1001、国際寄託当局が規則10.2に
ビーオービー-17、ランケアロカートル
ダニスコ バイオテクノロジー

| | |
|---|-------------------------|
| I. 寄託者 | II. 微生物の表示 |
| 名称：同上 | 国際寄託当局により与えられた 受託番号： |
| 住所： | NCIMB 40653 |
| | 寄託または移送の日付： |
| | 1994年6月20日 |
| III. 生存に関する証明 | |
| 上記 II に表示された微生物の生存を1994年6月22日に試験した | |
| 2. この日に当該微生物は | |
| <input type="checkbox"/> ³ 生存していた | |
| <input type="checkbox"/> ³ 生存していなかった | |

¹ 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、
関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。

² 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試
験のことを指す。

³ 該当する四角に×印を付ける。

| | |
|---|---|
| IV. 生存試験を行った条件 ⁴ | |
| | |
| V 国際寄託当局 | |
| 名称：エヌ-アイエムビ- リミテッド 住所：イギリス国 エビ-2 ラルワイ スコットランド アバディーン セント マチャードライフ 23 | 国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年6月30日 |

⁴ 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰
性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

| | |
|--|--|
| 寄託者の氏名および住所 デソマーク、コペンハーゲン ケー、ティーケー1001、 ビーオービー-17、ランゲフロカード1. ダニスコ バイオテクノロジー | <u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した |
|--|--|

| | |
|--|--|
| I. 微生物の表示 | |
| 寄託者による識別のための表示 : 国際寄託当局により与えられた受託番号 : Esherichia coli K12 DH5 α -pMC NCIMB 40687 | |
| II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置 : | |
| Iで表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける) | |
| III. 受託および受理 | |
| この国際寄託当局は、上記Iで表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) ¹ に受け付けて受理している | |
| IV. 転換のための請求の受託 | |
| 上記Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付)および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された(転換要請受理の日付)。 | |
| V. 国際寄託当局 | |
| 名称 : エヌ・アイ・エム・ビー・リミテッド 住所 : イギリス国 エ-ビー-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント マチャードライア 23 | |
| 国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付 : 1994年10月6日 | |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を
取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

生存に関する証明書の宛人 原寄託についての受託証
 の名称および住所 次の頁に記載されている
 ティマード、コハルケンスケー、ティーカー1001、国際寄託当局が規則10.2に
 ピオービー17、ラシケアロガート1.
 従って発行した
 タニスコ パイオテクノロジー

| | |
|--|------------------------------------|
| I. 寄託者 | II. 微生物の表示 |
| 名称：同上 | 国際寄託当局により与えられた受託番号： NCIMB 40687 |
| 住所： | 寄託または移送の日付： 1994年10月3日 |
| III. 生存に関する証明 | |
| 上記IIに表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した | |
| ¹ . この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> ³ 生存していた <input type="checkbox"/> ³ 生存していなかった | |

- ¹ 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。
- ² 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試験のことを指す。
- ³ 該当する四角に×印を付ける。

| | |
|--|---|
| IV. 生存試験を行った条件 ⁴ | |
| | |
| V 国際寄託当局 | |
| 名称：エシーアイエムビーリミテッド 住所：イギリス国 エーピー2 1アールワイ スコットランド アバディーン セント マチヤードライ 23 | 国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日 |

⁴ 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

| | |
|---|--|
| 寄託者の氏名および住所 デソマーク、コヘンハーゲン ケー、デンマーク-1001、 ヒ-オ-ヒ-17、ランゲンブルガート1。 ケニスコ バイオテクノロジー | <u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した |
|---|--|

| | |
|---|--|
| I. 微生物の表示 | |
| 寄託者による識別ための表示 : 国際寄託当局により与えられた受託番号 : Esherichia coli K12 DH5 α -pMV1 NCIMB 40688 | |
| II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置 : | |
| Iで表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける) | |
| III. 受託および受理 | |
| この国際寄託当局は、上記 Iで表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) ¹ に受け付けて受理している | |
| IV. 転換のための請求の受託 | |
| 上記 Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付)および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された。 | |
| V. 国際寄託当局 | |
| 名称 : エヌ-アイエムビ-リミテッド 国際寄託当局の代表者 住所 : イギリス国 イ-ヒ-2 17-ルワイ または事務局長の署名 スコットランド アバディーン セント マチャードライブ 23 日付 : 1994年10月6日 (署名) | |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を
取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

生存に関する証明書の宛人 原寄託についての受託証
 の名称および住所 次の頁に記載されている
 テンマーク、コペンハーゲン、ディケ-1001、国際寄託當局が規則10.2に
 ピ-オ-ビ-17、ランゲアムガード1。
 従って発行した
 グニスコ パイオテクノロジー

| | |
|--|---------------------------|
| I. 寄託者 | II. 微生物の表示 |
| 名称：同上 | 国際寄託當局により与えられた受託番号： |
| 住所： | NCIMB 40688 |
| | 寄託または移送の日付： 1994年10月3日 |
| III. 生存に関する証明 | |
| 上記 II に表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した 2. この日に当該微生物は <input type="checkbox"/> ³ 生存していた <input type="checkbox"/> ³ 生存していなかった | |

¹ 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、
関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。

² 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試
験のことを指す。

³ 該当する四角に×印を付ける。

| | |
|--|---|
| IV. 生存試験を行った条件 ⁴ | |
| | |
| V 国際寄託當局 | |
| 名称：エヌ-アイエムビ-リミテッド 住所：イギリス国 エ-ヒ-2 17-ルワイ スコットランド ハーディング セント マチュー ドライフ 23 | 国際寄託當局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日 |

⁴ 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

| | |
|--|--|
| 寄託者の氏名および住所 デンマーク、コペンハーゲン、ティーケー1001、 ビーオービー-17、ラーガニアガード1。 ダニエル・イオネン | <u>原寄託についての受託証</u> この頁の下部に記載されて いる国際寄託当局が規則 7.1に従って発行した |
|--|--|

| | |
|---|---|
| I. 微生物の表示 | |
| 寄託者による識別のための表示 : 国際寄託当局により与えられた受託番号 : Esherichia coli K12 DH5 α -pMV2 NCIMB 40689 | |
| II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置 : | |
| Iで表示された微生物は以下を伴っていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置 (該当するところに×印を付ける) | |
| III. 受託および受理 | |
| この国際寄託当局は、上記 Iで表示される微生物を1994年10月3日 (原寄託の日付) ¹ に受け付けて受理している | |
| IV. 転換のための請求の受託 | |
| 上記 Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原 寄託の日付)および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換 する要請は受理された。 | |
| V. 国際寄託当局 | |
| 名称 : エヌ・アイ・エム・ビー・リミテッド 住所 : キリスト国 エビ-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セント チャーチドライブ 23 | 国際寄託当局の代表者 または事務局長の署名 (署名) 日付 : 1994年10月6日 |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を
取得した日付となる。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

生存に関する証明書の宛人 原寄託についての受託証
の名称および住所 次の頁に記載されている
デノマーク、コペンハーゲン、ティーケ-1001、国際寄託当局が規則10.2に
ヒ-オ-ヒ-17、ランゲンブルガート1。
従って発行した
ダニスコ ハイオテクノロジー

| | |
|---|--|
| I. 寄託者 | II. 微生物の表示 |
| 名称：同上 | 国際寄託当局により与えられた 受託番号： NCIMB 40689 |
| 住所： | 寄託または移送の日付： 1994年10月3日 |
| III. 生存に関する証明 | |
| 上記IIに表示された微生物の生存を1994年10月3日に試験した この日に当該微生物は | |
| <input type="checkbox"/> ³ 生存していた <input type="checkbox"/> ³ 生存していなかった | |

- ¹ 原寄託の日付、あるいは再寄託または移送が行われた場合には、関連する最新の日付（再寄託日または移送日）を示す。
- ² 規則10.2(a)(ii)および(iii)に記載した場合には、最新の生存試験のことを指す。
- ³ 該当する四角に×印を付ける。

| | |
|---|---|
| IV. 生存試験を行った条件 ⁴ | |
| | |
| V 国際寄託当局 | |
| 名称：エヌ-アイムヒー・リミテッド 住所：イギリス国 イ-ヒ-2 17-ルワイ スコットランド アバディーン セイント マチュー ドライブ 23 | 国際寄託当局の代表者または 事務局長の署名（署名） 日付：1994年10月6日 |

⁴ 生存試験を行った条件情報が必要ならば、および試験の結果が陰性ならば記入する。

補遺 3
14 頁

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式

原寄託についての受託証

寄託者の氏名および住所
デンマーク、コペンハーゲン、ティイケ-1001、
ビ-オ-ビ-17、ラグアブロガード1
タニスコ バイオテクノロジー

この頁の下部に記載されて
いる国際寄託当局が規則
7.1に従って発行した

I. 微生物の表示

寄託者による識別ための表示： 国際寄託当局により与えられた受託番号：
株番号:GLQ-1(Qingdao) 受託番号：
CCAP 1373/1

II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：

Iで表示された微生物は以下を伴っていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置
(該当するところに×印を付ける)

III. 受託および受理

この国際寄託当局は、上記 Iで表示される微生物を1994年5月10日
(原寄託の日付)¹に受け付けて受理している

IV. 転換のための請求の受託

上記 Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、(原
寄託の日付)および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換
する要請は受理された(転換要請受理の日付)。

V. 国際寄託当局

| | |
|--|----------------|
| 名称：カルチャー コレクション オフ アルケ- | 国際寄託当局の代表者 |
| アント フロトゾフ | または事務局長の署名 |
| 住所：キリス国 ビ-1-34 4エ-ティ-、 | (署名) |
| ア-ギル、オバソ、ビ-、オ-、オ-、オ-、 タ-ンスタウフネイシ、マリン ラボラトリ- | 日付：1994年11月10日 |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を
取得した日付となる。

補遺 3
14頁特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約
国際様式原寄託についての受託証

寄託者の氏名および住所
 デンマーク、コペンハーゲン、ティーケー1001、
 ピーオービー-17、ランケアロード1
 タニスコ パイオティログ

この頁の下部に記載されて
 いる国際寄託当局が規則
 7.1に従って発行した

I. 微生物の表示

寄託者による識別そのための表示： 国際寄託当局により与えられた受託番号：
 株番号:GLSC-1(California) CCAP 1373/2

II. 科学的性質および／または提示された分類学上の位置：

Iで表示された微生物は以下を伴っていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置
 (該当するところに×印を付ける)

III. 受託および受理

この国際寄託当局は、上記 Iで表示される微生物を1994年5月10日（原寄託の日付）¹に受け付けて受理している

IV. 転換のための請求の受託

上記 Iで表示される微生物はこの国際寄託当局で受理され、（原寄託の日付）および、ブダペスト条約による寄託の原寄託を転換する要請は受理された（転換要請受理の日付）。

V. 国際寄託当局

| | |
|--|------------------------|
| 名称：カルチャー コレクション オブ アルゲ- | 国際寄託当局の代表者 |
| アンド アロトロニア | または事務局長の署名 |
| 住所：キリスト教イエス・キリスト教会、 アーキル、オハノ、ビーオー・ボウルズ3、 タンクストラッセマリエンボーラリー | (署名) 日付：1994年11月10日 |

¹ 規則6.4(d)が適用された場合、当該日付は国際寄託当局の地位を取得した日付となる。

【図1】

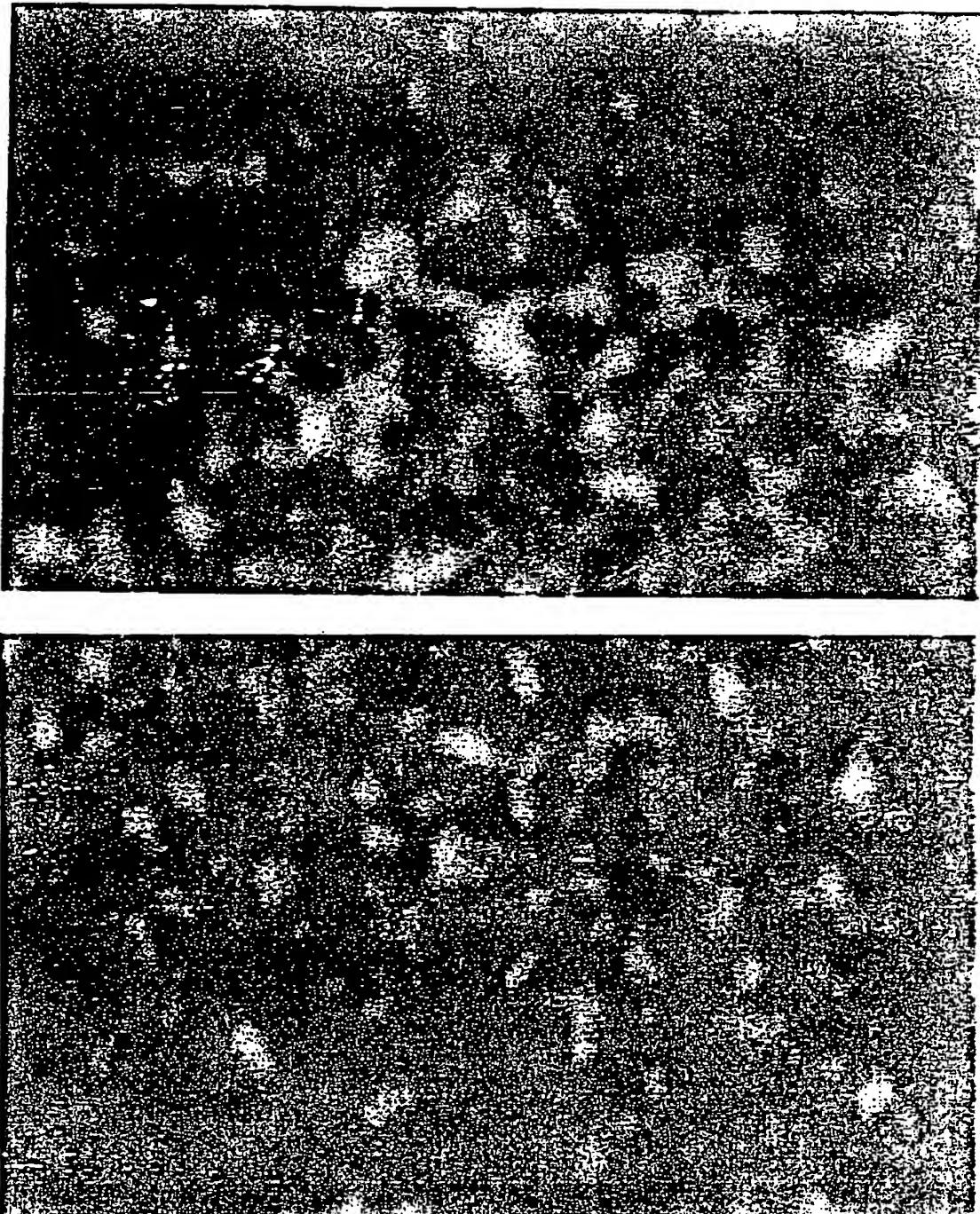


Fig. 1. *Gracilaria lemaneiformis* の上部および下部での菌類を表すCalcoflour White染色。($108\times$ および $234\times$)。

【図 2】



Fig. 2. 菌類を有する *Gracilaria lemaneiformis* の PAS/Anilinblue Black 染色。
菌類は顕著により高い炭水化物を含有する。

【図 3】

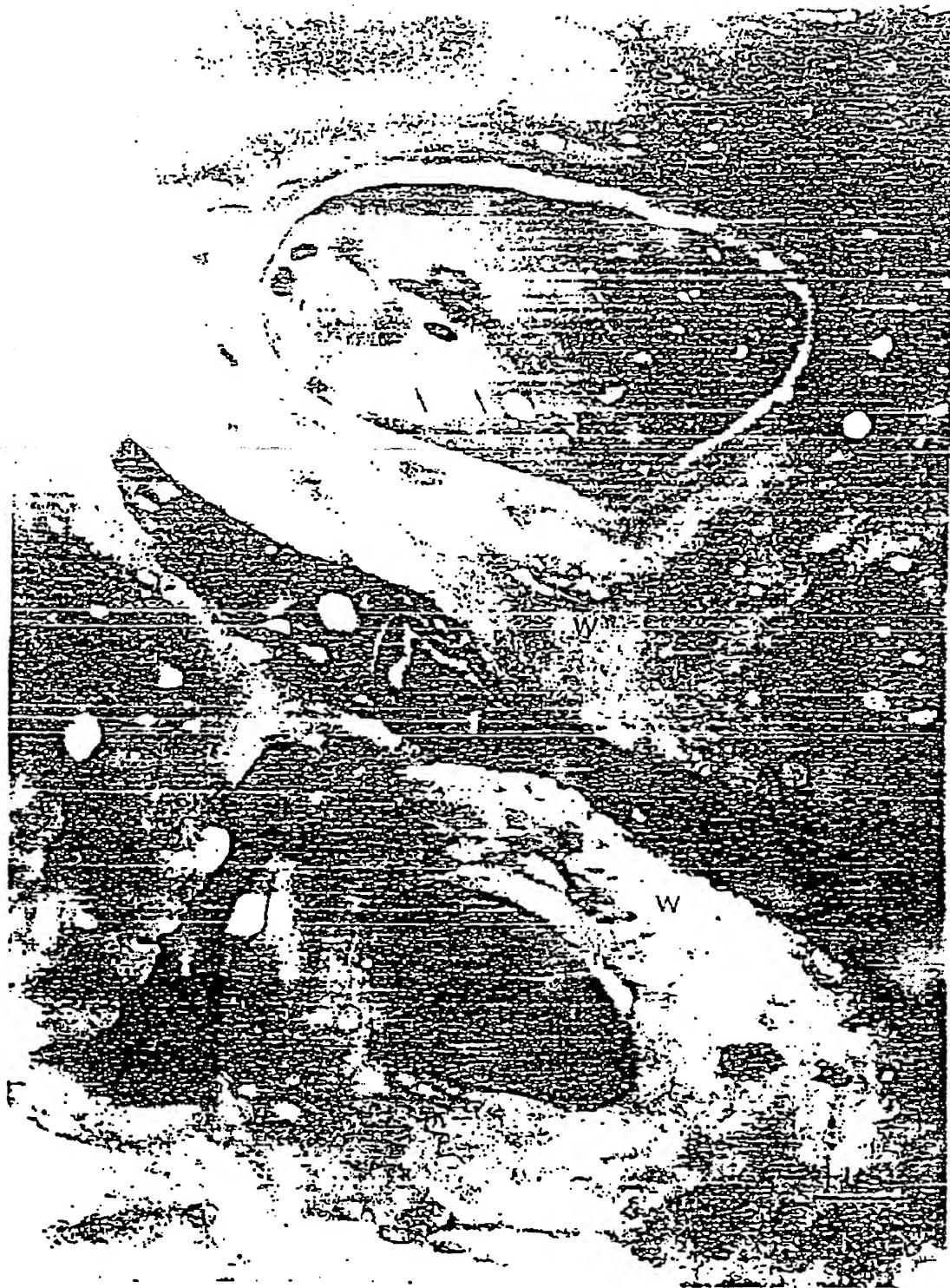


Fig. 3. 頸微鏡写真は藻類細胞の厚い壁 (w) 間で成長する二つの薄い壁の菌類菌糸 (f) の縦方向で表面付近の切片を示す。藻類のクロロプラスト中のチコライド膜に留意 (矢印)。

【図 4】



Fig. 4. クローン2プローブを用いたアンチセンス検出（上列）は、次の切片のC alcoflour White染色（下列）により示される菌類に限定されている。（46×および108×）。

【図 5】

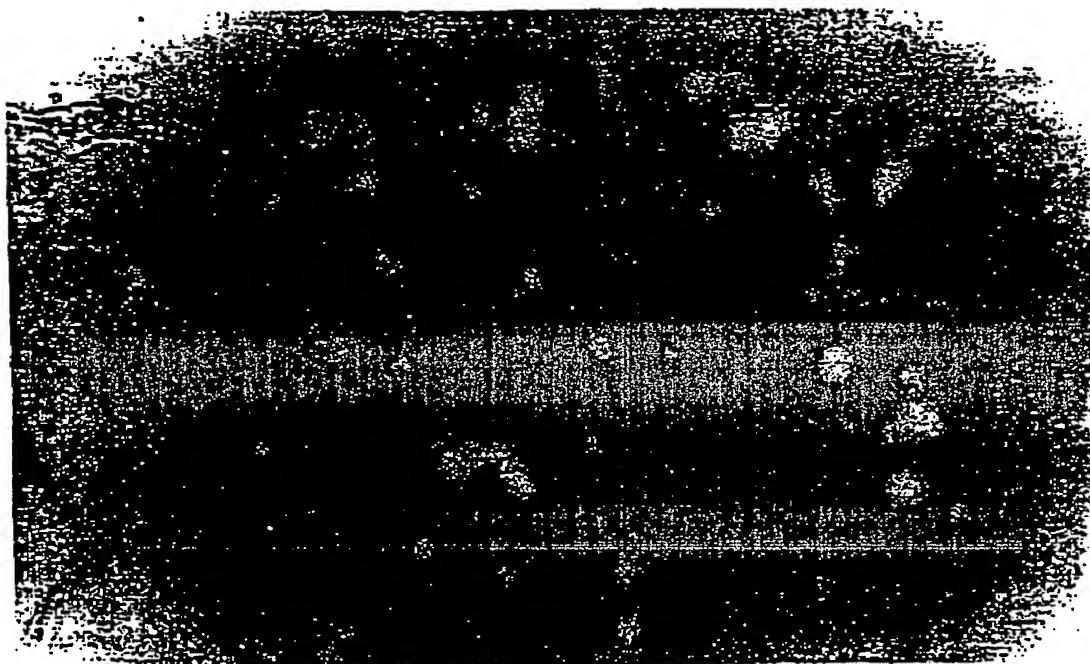
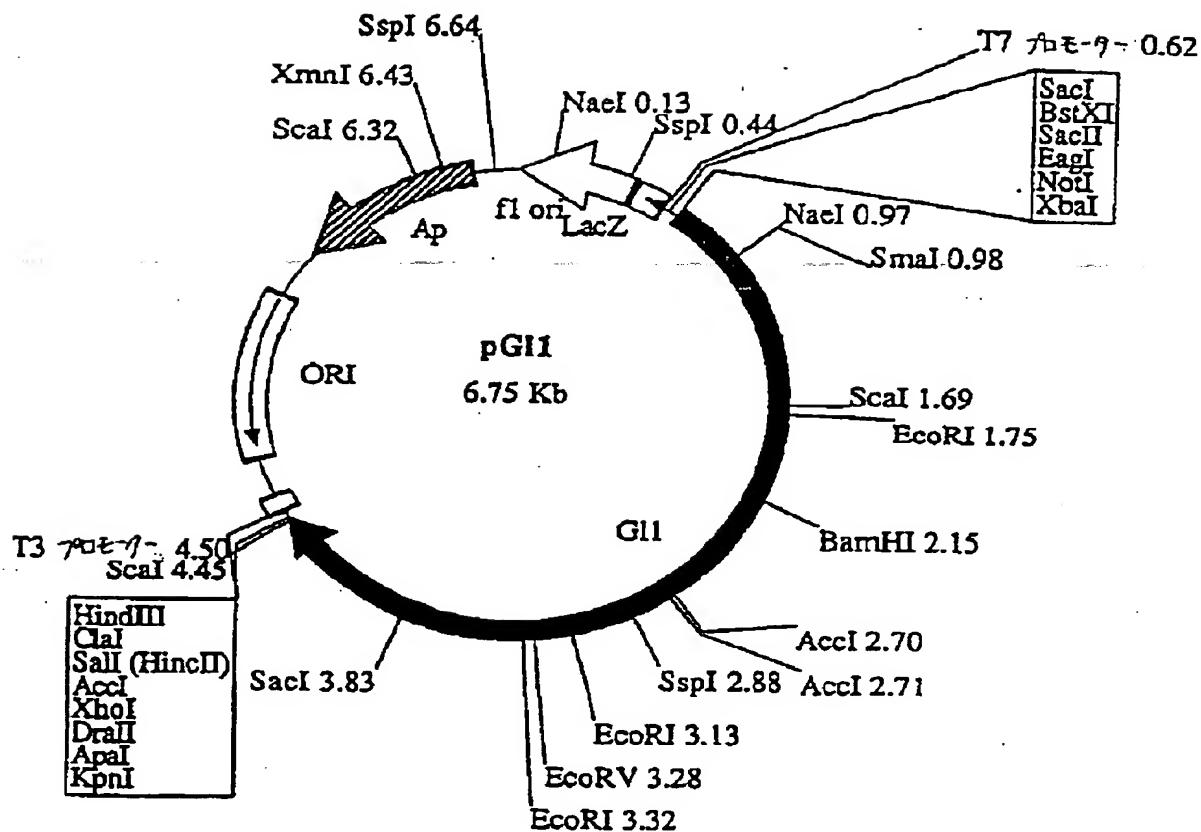


Fig. 5. プローブ 2 を用いた強いアンチセンス検出が *Gracilaria lemaneiformis* 中の菌類上に見出される (294×)。

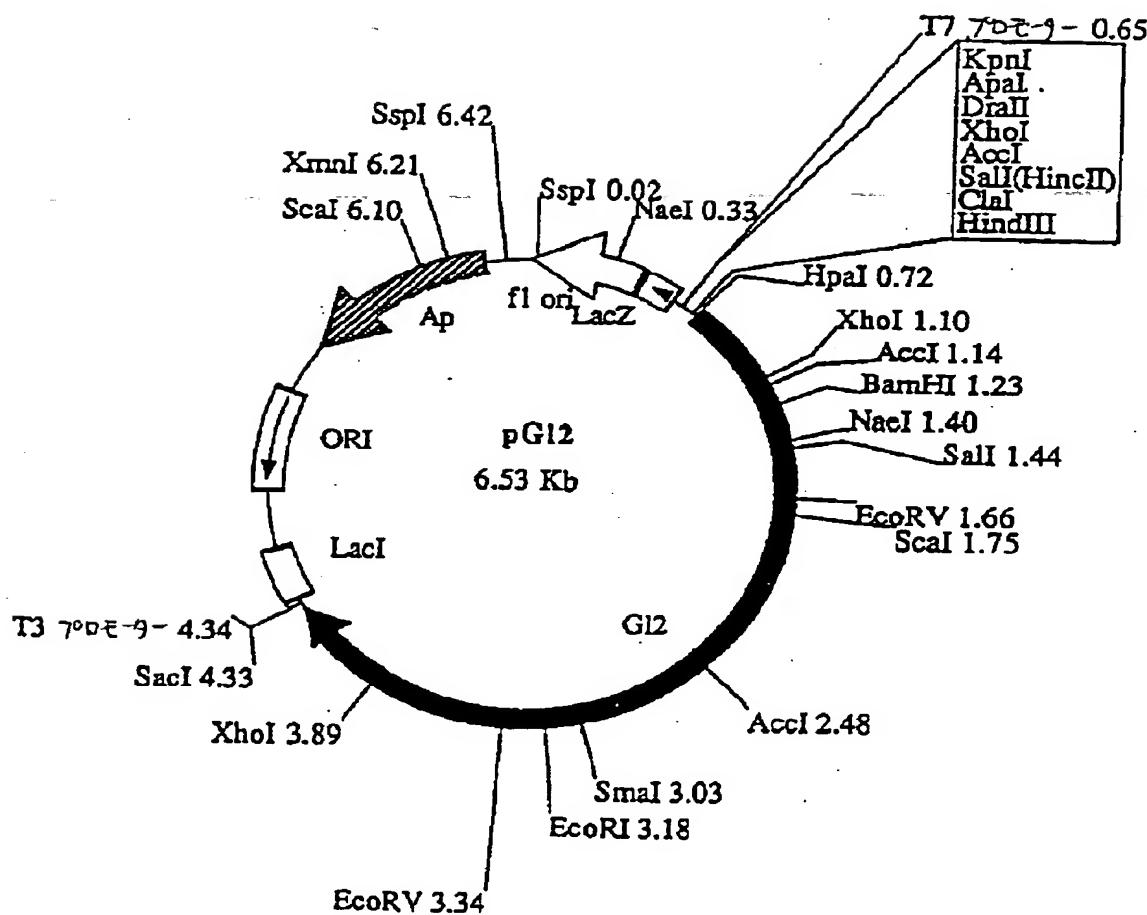
【図 6】

Fig. 6.



【 図 7 】

Fig. 7.



【図 8】

FIGURE 8

MFSTLAFVAP SALGASTFVG AEVRSNVRIH SAFAVAHTAT RKTNRLNVSM TALSDKQTAT AGSTDNPDG
 DYKTYDYVGV WGFPLSNTN WFAAGSSTPG GITDWTATMN VNFDRIDNPS ITVQHPVQVQ VTSYNNNSYR
 VRFNPDPPIR DVTRGPILKQ QLDWIRTQEL SEGCDCPGMTF TSEGFLTET KDLSVIIYGN FKTRVTRKSD
 GKVIMENDEV GTASSGNKCR GLMFVDRLYG NAIASVNKNF RNDAVKQEGF YGAGEVNCKY QDTYILERG
 IAMTNYYDN LNYNQWDLRP PHHDGALNPD YYIPMYYAAP WLIVNGCAGT SEQYSYGFWM DNVSQSYMNT
 GDTTWNSGQE DLAYMGAQYG PFDQHFVYGA GGGMECVVTA FSLLQGKEFE NQVLNKR SVM PPKYVFGFFQ
 GVFGTSSLLR AHMPAGENNI SVEEIVEGYQ NNNFPFEGLA VDVDMQDNLR VFTTKGEFWT ANRVGTGGDP
NNRSVFEWAH DKGLVCOTNI TCFLRNDNEG QDYEVNQTLR ERQLYTKNDS LTGTDFGM TD DGPSDAYIGH
LDYGGGV ECD ALFPDWGRPD VAEWGNNYK KLFSIGLDFV WQDMTPAMM PHKIGDDINV KPDGNWPNA
DPSNGQYNWK TYHPOVLYTD MRYENHGREG MYTORNHAY TLCESTRKEG IVENADTLK FRRSYIISRG
GYIGNQHFGG MWVGDNSTTS NYIQMMIANN INMNMSCLPL VGSDIGGFTS YDNENQRTPC TGDLMVRYVO
AGCLLPWFBN HYDRWIESKD HGKDYQELYM YPNEMDTLRK FVEFRYRHQE VLYTAMYONA AFGKPIIKA
SMYNNDSNVR RAQNDHFLLG GHDGYRILCA PVVWENSTER ELYLPVLQW YKFGPDFDTK PLEGAMNGGD
RIYNYPVPQS ESPIFVREGA ILPTRYTLNG ENKSLNTYTD EDPLVFEVFP LGNNRADGMC YLDDGGVTIN
AEDNGKFSVV KVAEEQDG GT ETITFTNDCY EYVFGGPFYV RVRAQSPSN IHVSSGAGSQ DMKVSSATSR
AALFNDGENG DFWDQETDS LWLKLPNVVL PDAVITIT

〔 図 9 〕

FIGURE 9

| | |
|-----|--|
| GL1 | - MFSTLAFVAPSALGASTFVGAEV-RSNVRISHAFAFPAVHTATRKTNRLNVS -49 |
| GL2 | - MYPTLTIVAPSALGARTFTCVGIFRSHLIHSVVPAVRLAVRKSNLNVS -50 |
| GL1 | - MTALSDKQTATAGSTDNPDGIDYKTYDYGWGFSPSNTNWFAAGSSTP -99 |
| GL2 | - MSALFDKPTAVTGGKDNPDNINYTTDYPVWRFDPLSNTNWFAAGSSTP -100 |
| GL1 | - GGITDWTATMNVNFDRIDNPSITVQHPVQVQVTSYNNNSYRVRFNPDGPI -149 |
| GL2 | - GDIDDWATMNVNFDRIDNPSITLEKPVQVQVTSYKNNCFRVRFNPDGPI -150 |
| GL1 | - RDVTRGPILKQQLDWIRTQESEGCDPGMTFTSEGFLTFETKDLVIIYG -199 |
| GL2 | - RDVDRGPILQQQLNWIRKQEKSQKGFDPKMGFTKEGFLKFETKDLVIIYG -200 |
| GL1 | - NFKTRVTRKSDGKVIMENDEVGTASSGNKCRGLMFVDRLYGNAIASVNKN -249 |
| GL2 | - NFKTRVTRKRDGKGIMENNEVPAGSLGNKCRGLMFVDRLYGTAIASVNEN -250 |
| GL1 | - FRNDAVKQEGFYGAGEVNCKYQDT-----YILER TGIA M TN NY DN L NY -293 |
| GL2 | - YRN D PDR KEGFYGAGEVNCEFWOSEQNRNKYI LERTGIA M TN NY DN NY -300 |
| GL1 | - NQWDLRPPHHDGALNPDYIIPMYYAAPWLIVNGCAGTS-EQYSYGFMDN -342 |
| GL2 | - NQSDLIAP--GYP SDPNFYIIPMYFAAPWVVVKCGSGNSDEQYSYGFMDN -348 |
| GL1 | - VSQSYMNTGDTTWSNSQEDLAYMGAQYGPFDQHFVYGA GGGM EC VV TAF S -392 |
| GL2 | - VSQTYMNTGGTSWNCGEENLAYMGAQCQGPFDQHFVYGDGDGLEDV V QAF S -398 |
| GL1 | - LLQGKEFENQVLNKR SVMPPKYVFGFFQGVFGTSSLRAHMPAGENNISV -442 |
| GL2 | - LLQGKEFENQVLNKR AVMPPK YVFGYFQGVFGIASLLREQRPEGGN NISV -448 |
| GL1 | - EEIVEGYQNNNFPFEGLA VDVMQDNLRVFTTKGEFWTANRVGTGGDPNN -492 |
| GL2 | - QEIVEGYQSNNFPLEG LA VDVMQQDLRVFTTKIEFWTANKVGTGGDSNN -498 |
| GL1 | - RSVFEWAHDKG LVCQTNITCFLRN DNEGQDYEVNQTLRERQLYT KND SLT -542 |
| GL2 | - KSVFEWAHDKG LVCQTNVTCFLRN DNGGADYEVNQTLREKG LYTKND SLT -548 |
| GL1 | - GTDFGM TDG P S DAYIGHLDYGGGVECDALFPDWGRPDVAEWNGNNYKKL -592 |
| GL2 | - NTNF GTT NDG P S DAYIGHLDYGGGNC DALFPDWGRPGVAEWNGDN YSKL -598 |
| GL1 | - FSIGLDFVWQDMTVPAMMPHKIGDDINVKP DGNWPNA DDPSNGQY NWK TY -642 |
| GL2 | - FKIGLDFVWQDMTVPAMMPHKVGDAVDRSPYGP NENDPSNGR YNW KSY -648 |
| GL1 | - HPQVLVTD MRYENHG REPMV TQR NI HAY TL CESTRKE GIVE NA DTL TKFR -692 |
| GL2 | - HPQVLVTD MRYENHG REPMFTQR NMHAY TL CESTRKE GIVANADTL TKFR -698 |

【図 9】

FIGURE 9 略

| | |
|-----|---|
| GL1 | - RSYIISRGGYIGNQHFGGMWVGDNSTTSNYIQMMIANNINMNMSC1PLVG -742 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - RSYIISRGGYIGNQHFGGMWVGDNSSSQRYLQMMIANJVNMMNSCLPLVG -748 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - SDIGGFTSYDNENQRTPCTGDLMVRYVQAGCLLPWFRNHDRWIESKDHG -792 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - SDIGGFTSYDG---RNVCPGDLMVRFVQAGCLLPWFRNHGRVLVEGKQEG -795 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - KDYQELYMYPNEMDTLRKFVEFRYRWQEVLYTAMYQNAAFGKPIIKAASM -842 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - KYYQELYMYKDEMATLRKFIEFRYRWQEVLYTAMYQNAAFGKPIIKAASM -845 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - YNNDSNVRAQNDHFLLGGHDGYRILCAPVVHENSTERELYLPVLTQWYK -892 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - YDNDRNVRGAQDDHFLLGGHDGYRILCAPVVHENTTSRDLYLPVLTQWYK -895 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - FGPDFDTKPLEGAMNGGDRIYNYPVPQSESPIFVREGAILPTRYTLNGEN -942 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - FGPDYDTKRLDSALDGGQMJKNYSPVQSDSPIFVREGAILPTRYTLDSN -945 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - KSLNTYTDPLVFEVFPLGNRADGMCYLDDGGVTNAEDNGKFSVVKV -992 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - KSMNTYTDKDPVFEVFPLGNRADGMCYLDDGGITDAEDHGKFSVINV -995 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - AAEQDGGETITFTNDCYEYVFGGPFYVRVRGAQSPSNIHVSSGAGSQDM -1042 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - EALRKGVTTTIKFAYDTYQYVFDGPFYVRIRNLTTASKINVSSGAGEEDM -1045 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL1 | - KVSSATSRAALFNDGENGFVWDQETDSLWLKLPNVLPDAVITIT -1088 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |
| GL2 | - TPTSANSAALFSDGGVGHEYWADNDTSSLWMKLPNLVLQDAVITIT -1091 :::.....:::.....:::.....:::.....:::.....:::.....::: |

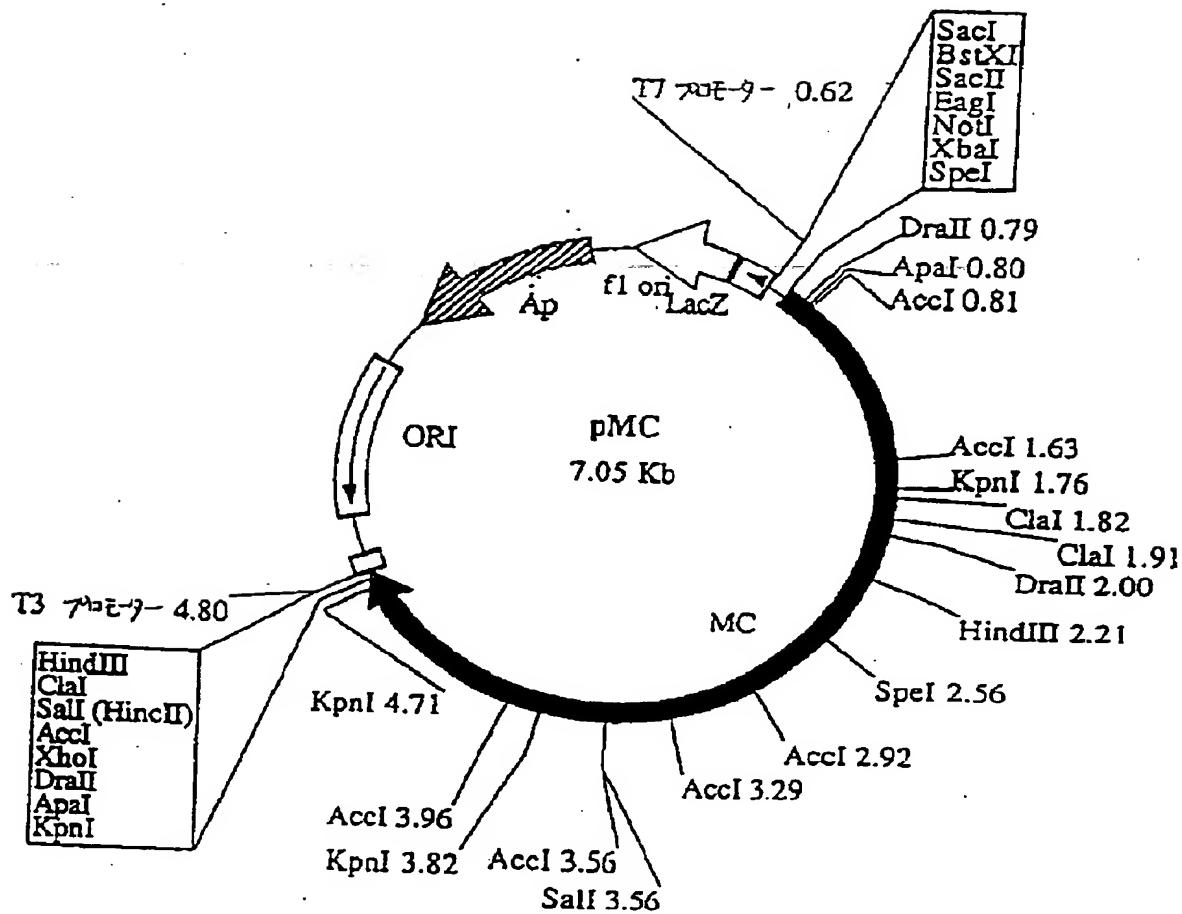
【 図 10 】



Fig. 10. 藻類の壁 (W) 間で成長した菌糸 (f) の顕微鏡写真。藻類細胞中の紅藻
デンプン (s) およびチラコイド (矢印) の粒子に留意。
バー = $2 \mu\text{m}$ 。

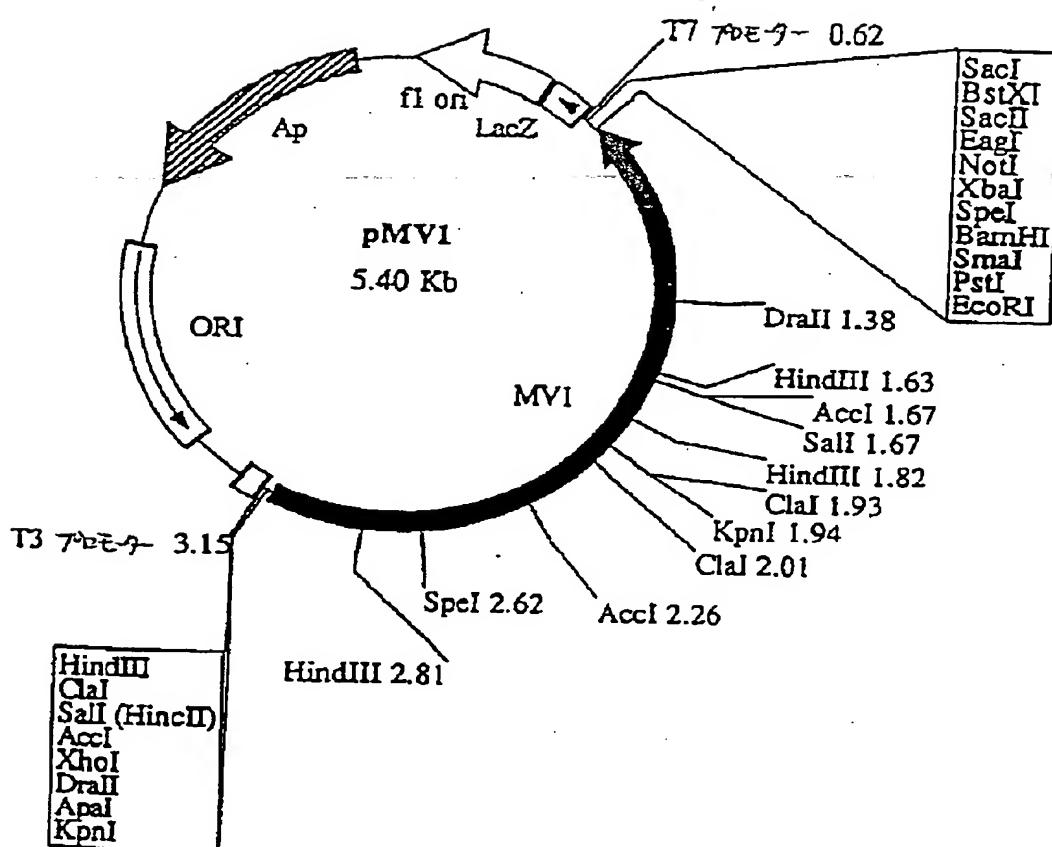
【図 11】

FIG 11



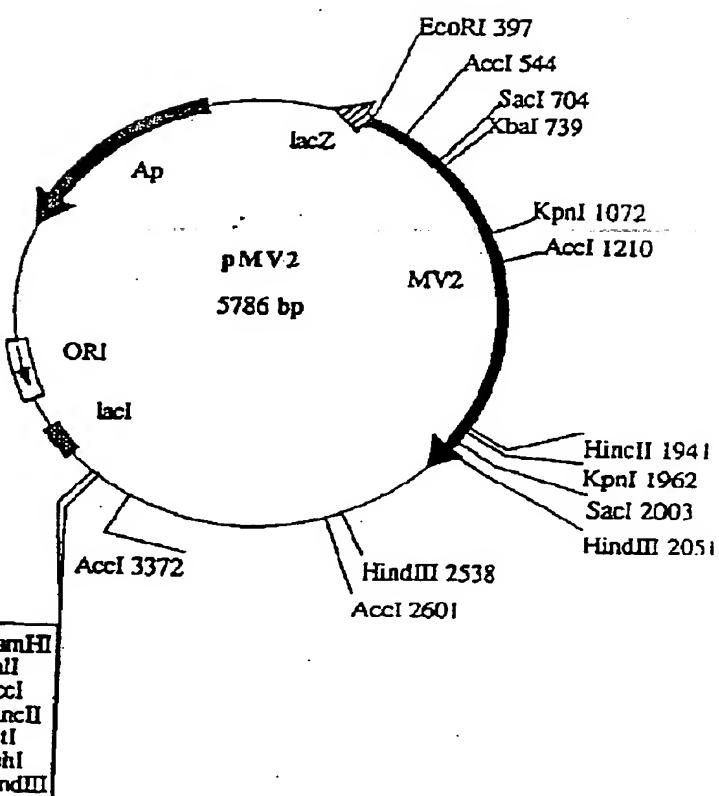
【図 12】

Fig12



【図 1 3】

Fig13



【図 14】

FIGURE 14

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|-----------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 1 AGACAGGTGC | GT | TTTGT | TTT | ATTC | TATTCT |
| 61 ATTGTACAAA | TAT | TTCTAAT | TACAG | TTGTA | GGTGCAG |
| 121 TCATTGATGC | ACAA | AGATGA | TAAC | GCTGA | TTAGTACTCA |
| 181 GCGACCTCTC | TTT | GGCTAGC | ATTAC | CTGAT | TGGTACAAC |
| 241 TGAGGAATGA | AGTC | CAGCATC | GATAG | CTCGG | CCTCATAAAA |
| 301 CCCAGTTTA | ATCT | CGAATC | CTAT | ATAATG | GCCATCGTTC |
| 361 CCTCCATCAC | TCC | AGCTCAG | TCAT | CCCTCA | ACTTGGCCTC |
| 421 AACATCTTGT | CCA | ATCTTTT | TTTGAGCTAG | ATCTCATTAT | ACCTCCGTCA |
| 481 TTCTGATCCT | CTCA | ACTTTT | GC | AAAGCAGA | AGACTACTAC |
| 541 GGGCCCTCAA | AAA | ATCATTG | GAGTAGACAC | TACTCCTCCA | AAGAGCACCA |
| 601 AAAC | ACTGGCAT | GGAGTGA | ACT | TGAGATTG | TGATGGACT |
| 661 TAGGCCGTG | CT | TTGGAGGG | TTAGATA | CG | ACGAGTATGG |
| 721 TGATGAGAAT | ACGTGAGTTA | CCCC | CATATGT | CATTATTGGT | AGCGAAAAAC |
| 781 CAACTAACGA | GGC | ATATAGG | AGGACAATTG | TGCAAGATTA | TATGAGTACT |
| 841 AATTGGATAC | TTA | TAGAGGT | CTTACGTGGG | AAACCAAGTG | TGAGGATTG |
| 901 TTACCTCTC | AGT | AAAGTGC | AGTACTG | CATAGCTCG | ATATATATAA |
| 961 TAACTGCCCT | AA | ATAGTCCA | AGGT | CACCGC | CGTTGAAAAA |
| 1021 GGT | CGGCGAT | GGC | CCTCAGAA | TTCAC | CTATG |
| 1081 CAC | CTTGACC | CCTT | GAAGG | ATC | CTTAC |
| 1141 TGT | TCCGAC | AAG | GTCTT | GGC | AAACGTC |
| 1201 GCA | ACACAAG | ATG | CTAAAGG | ATAC | AGTCT |
| 1261 TGT | GGGGTGG | GG | AGAGATGG | GAGG | TATGAAG |
| 1321 TTT | AGTAAG | CCC | GAAGAG | GTT | CCTATA |
| 1381 TGT | AGACTTC | GAC | AAATATGC | AA | TACAG |
| 1441 CGAGCCACTG | TAAGTACCGT | CCT | GTGGCAC | GA | CTTAACCC |
| 1501 GGT | ACCACTC | GG | ATCCCTTC | TAT | CTTGATG |
| | | | | | TGAACTCCA |
| | | | | | CCC |
| | | | | | GGAGCAC |
| | | | | | AAGAATATCA |

【図14】

FIGURE 14 続き

1561 CGGCAACCTT TATCGATAAC TACTCTCAA TTGCCATCGA CTTGGAAAG ACCAACCTCAG
 1621 GCTACATCAA GCTGGGAACC AGGTATGGTG GTATCGATTG TTACGGTATC AGTGCAGGATA
 1681 CGGTCCCGGA AATTGTACGA CTTTACAG GTCTTGTGG ACGTTCAAAG TTGAAGCCCCA
 1741 GATATATTCT CGGGGCCCAT CAAGCCTGTA AGTCCTCCC CTCATGAGTG ATTTATCAGA
 1801 CTTGCATAAT AAACTAACCT CGTTTCAAAG GGTTATGGAT ACCAACACAGGA AAGTGACTTG
 1861 TATTCTGTGG TCCAGCAGTA CCGTGACTGT AAATTCAC TTGACGGGAT TCACGTCGAT
 1921 GTCGATGTTC AGGTAAATGG CCATGGTATC ATTGAAGCTT TGAGAAATGT TCTAACTGTG
 1981 TTTATAACAT TCCTAGGACG GCTTCAGAAC TTTCACCAACC AACCCACACAA CTTCCCTAA
 2041 CCCCAAAGAG ATGTTTACTA ACTTGAGGAA TAATGGAATC AAGTGCTCCA CCAATATCAC
 2101 TCCTGTTATC AGCATTAAACA ACAGAGAGGG TGGATACAGT ACCCTCCTTG AGGGAGTTGA
 2161 CAAAAAAATAC TTTATCATGG ACGACAGATA TACCGAGGGAA ACAAGTGGGA ATGCGAAGGA
 2221 TGTCGGTAC ATGTAATACG GTGGTGGTAA TAAGGTTGAG GTGATCCTA ATGATGTTAA
 2281 TGGTCGGCCA GACTTTAAAG ACAACTAGTG AGTTGTTAT TTGACTACGA TAGGTAACCC
 2341 GTAAGCGGCA TTAACATATT TGTAGTACT TCCCCGCGAA CTTCAACAGC AAACAATACC
 2401 CCTATCATGG TGGGTGTGAGC TACGGTTATG GGAACGGTAG TGTAAGTGAC GATATCTCAC
 2461 CAACATAATG AAATTTATAA GGACTAACTA GACACAAAAA TTGTAGGGCA GGTTTTTAC
 2521 CGGACCTCAA CAGAAAGGAG GTTCGTATCT GGTGGGGAAAT GCAGTACAAG TATCTCTTCG
 2581 ATATGGGACT GGAATTGTTG TGGCAAGACA TGACTACCCC AGCAATCCAC ACATCATATG
 2641 GAGACATGAA AGGGTTGCC ACCCGTCTAC TCGTCACCTC AGACTCCGTC ACCAATGCCT
 2701 CTGAGAAAAA GCTCGCAATT GAAACTTGGG CTCTCTACTC CTACAATCTC CACAAAGCAA
 2761 CTTGGCATGG TCTTAGTCGT CTCGAATCTC GTAAGAACAA ACGAAACTTC ATCCTCGGGC
 2821 GTGGAAGTTA TGCCGGAGCC TATCGTTTG CTGGTCTCTG GACTGGGGAT AATGCAAGTA
 2881 ACTGGGAATT CTGGAAAGATA TCGGTCTCTC AAGTTCTTC TCTGGGCCTC AATGGTGTGT
 2941 GCATCGCGGG GTCTGATACG GGTGGTTTG AACCCTACCG TGATGCAAAT GGGGTCGGAGG
 3001 AGAAATACTG TAGCCAGAG CTACTCATCA GGTGGTATAC TGGTTCATTG CTCTGCCGT
 3061 GGCTCAGGAA CCATTATGTC AAAAGGACA GGAAATGGTT CCAGGTAATC TATCCTTCT

【図14】

FIGURE 14 続き

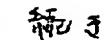
3121 TATCTTGAA GCATTGAAGA TACTAAGATA TAATCTAGGA ACCATACTCG TACCCCAAGC
 3181 ATCTTGAAAC CCATCCAGAA CTCGCAGACC AAGCATGGCT CTATAAATCC GTTTGGAGA
 3241 TCTGTAGGTA CTATGTGGAG CTTAGATACT CCCTCATCCA ACTACTTAC GACTGCATGT
 3301 TTCAAAACGT AGTCGACGGT ATGCCAATCA CCAGATCTAT GGTATGTATT CTACCCCTAGG
 3361 CTTCCAGAGC AACATATGCT AACCAATTGA ACCTGGGTT CTAGCTCTG ACCGATACTG
 3421 AGGATACAC CTTCTCAAC GAGAGCCAAA AGTTCTCGA CAACCAATAT ATGGCTGGTG
 3481 ACGACATTCT TGTTGCACCC ATCCTCCACA GTCGCAAAGA AATTCCAGGC GAAAACAGAG
 3541 ATGTCTATCT CCCTCTTAC CACACCTGGT ACCCCTCAA TTTGAGACCA TGGGACGATC
 3601 AAGGAGTCGC TTTGGGAAT CCTGTCGAAG GTGGTAGTGT CATCAATTAT ACTGCTAGGA
 3661 TTGTTGCACC CGAGGATTAT AATCTTTCC ACAGCGTGGT ACCAGTCTAC GTTAGAGAGG
 3721 GTAAGCAGTA AAATAATCTC TTCCAGTTT CAAATACATT TAGCTAGTAG CTAACGCTAT
 3781 GAACCTACAG GTGCCATCAT CCCGCAAATC GAAGTACGCC AATGGACTGG CCAGGGGGGA
 3841 GCCAACCGCA TCAAGTTCAA CATCTACCCCT GGAAAGGATA AGTAAAATT CAATGATCAC
 3901 CCTGCATCTA TTCCATCGCT GGTTTCTTT ACCCTTAUTG ACTTCATTCC TCAAAATACA
 3961 GGAGTACTGT ACCTATCTG ATGATGGTGT TAGCCGTGAT AGTGCGCCGG AAGACCTCCC
 4021 ACAGTACAAA GAGACCCACG AACAGTCGAA GGTTGAAGGC GCGGAAATCG CAAAGCAGAT
 4081 TGGAAAGAAG ACGGGTTACA ACATCTCAGG AACCGACCCA GAAGCAAAGG GTTATCACCG
 4141 CAAAGTTGCT GTCACACAAG TAATACCGCC CTTGACTTGT ATCACTTCC GACATCATGC
 4201 TAATATTCT CTGTTTACCT CAAAGACGTC AAAAGACAAG ACGCGTACTG TCACTATTGA
 4261 GCCAAAACAC AATGGATACG ACCCTTCCAA AGAGGTGGGT GATTATTATA CCATCATTCT
 4321 TTGGTACGCA CCAGGTTTCG ATGGCAGCAT CGTCGATGTG AGCAAGACGA CTGTGAATGT
 4381 TGAGGGTGGG GTGGAGCACC AAGTTTATAA GAACTCCGAT TTACATACGG TTGTTATCGA
 4441 CGTGAAGGAG GTGATCGGTAA CCACAAAGAG CGTCAAGATC ACATGTACTG CCGCTTAAGG
 4501 TCTTTCTTG GGGGCAGGAG GCGAGACCTT CGAAATGTAT ACGGGAGTGG TAACTCCGGG
 4561 AAAATGGTGA TATGGGGGAT CAAGTTGGAG GGGAAATCTGT TTATTTCTTT ATTTCTTAT
 4621 TTACTGGATT GGAAAATAGG GAGCACAGTT CTGACTGGAT TGTTTGATT GTTGGCCTCT
 4681 ACGGGTTCTC TTTACTTTGT CTGGAAATCC AATTTATTGT TATGCC

【図 15】

FIGURE 15

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|---|----|----|----|----|----|
| : | : | : | : | : | : |
| 1 ATGCAGGCAA CGACAGGCGT TTTTGTTTT ATCCGCAGAG GTGCAGCAGC AGGAAACAAA | | | | | |
| 61 CCATACAAAC ATTCTTGAC GCGGTTTAG GTGCAGTTAA GGCCCAGGGCG CACCAAGAAC | | | | | |
| 121 ATTGATGTAC TTGGTCTAAA AAAGATCAT A ATACCCGATT AGTGTTCATG GTTGATTGG | | | | | |
| 181 GTCTAAGTAC AAGTTTACA GAGTTTACAGCT TAGTTCATTG TTGAAACTA CCAATATCAC | | | | | |
| 241 ACCTATGCCT GCTGGCATTG ATAGCTCGGC TTGTGAAAGC TGATTACAAT CTTACATTTC | | | | | |
| 301 TGATTTAATA TCAGGACTGAT CTATATATAA GGGTCATCAT TTCTCTCCG CCTTTGGTT | | | | | |
| 361 CTCTTCATC ACCCCAGCCC AATCATCACC GTTGGCCTTT ACCTCTCTCT TCCGTTGATA | | | | | |
| 421 TTTTCTCGAC AAAACATCTT GTCCACTGTT AGGCTAGCTC CCAGAATTAT CCCTCCAACA | | | | | |
| 481 TGGCAGGATT ATCCGACCCCTCTCAATTCT GCAGGAGCAGA GGAAGTACTAC GCTGCTGCCA | | | | | |
| 541 AAGGCTGGAG TGGCCCTCAG AAGATCATTC GCTATGACCA GACCCCTCCT CAGGGTACAA | | | | | |
| 601 AAGATCCGAA AAGCTGGCAT GCGGTAAACC TTCTTCGA TGACGGGACT ATGTGTGAG | | | | | |
| 661 TGCAATTCTGT CAGACCCCTGT GTTGGAGGG TTAGATATGA CCCAGTGTC AAGACTCTG | | | | | |
| 721 ATGAGTACGG CGATGAGAAT <u>ACGTGGGTG</u> <u>CCCAGTCAAT</u> <u>TAACATATGCC</u> GCTAGTGATT | | | | | |
| 781 <u>ATGGAAAGCT</u> <u>TCTGCTAAC</u> <u>GATCAATGAG</u> <u>GCATGTAGGA</u> GGAAGTATTGT ACAAGACTAC | | | | | |
| 841 ATGACTACTC TGGTTGGAAA CTTGGACATT TTCAGAGGTC TTACGTGGGT TTCTACGTTG | | | | | |
| 901 GAGGATTTCGG GCGAGTACTA CACCTCAAG <u>GCAAGCCTCA</u> <u>GTGTTATATC</u> <u>TCGAATATAT</u> | | | | | |
| 961 <u>TATATATCAC</u> <u>AACAAACTAA</u> <u>CTAGTCATAC</u> <u>AGTCCGAAGT</u> CACTGCCGTG GACGAAACCG | | | | | |
| 1021 AACGGACTCG AAACAAGGTC GGCACGGCC TCAAGATTTA CCTATGGAAA AATCCCTTTC | | | | | |
| 1081 GCATCCAGGT AGTGCCTCTC TTGACCCCCC TGGTGGACCC TTCCCCCATT CCCAACGTAG | | | | | |
| 1141 CCAATGCCAC AGCCCGTGTG GCCGACAAGG TTGTTGGCA GACGTCCCCG AAGACGTTCA | | | | | |
| 1201 GGAAAAACTT GCATCCGCAG CATAAGATGT TGAAGGATAC AGTTCTGAT ATTATCAAGC | | | | | |
| 1261 CGGGGCACGG AGAGTATGTG GTTGGGGAG AGATGGGAGG CATCGAGTTT ATGAAGGAGC | | | | | |
| 1321 CAACATTCAAT GAATTATTTCA <u>AGTAAGCTCT</u> <u>TGAAAGATTT</u> CCTATCTCTT <u>GACGGTCGTT</u> | | | | | |
| 1381 <u>TTTGCTAAC</u> <u>AAACTGTAGA</u> CTTGACAAT ATGCAATATC AGCAGGTCTA TGCACAAAGGC | | | | | |
| 1441 GCTCTTGATA GTCGTGAGCC GTTGTAGTA ACGTCCTGTG ACATGTCTG ATTACAGTAA | | | | | |
| 1501 <u>CTGATCGTTC</u> <u>AATAAGGTAT</u> CACTCTGATC CCTTCTATCT CGACGTGAAC TCCAAACCCAG | | | | | |

[図 15]

FIGURE 15 

1561 AGCACAAAGAA CATTACGGCA ACCTTTATCG ATAACACTC TCAGATTGCC ATCGACTTTG
 1621 GGAAGACCAA CTCAGGCTAC ATCAAGCTGG GTACCAGGTA TGGCGGTATC GATTGTTACG
 1681 GTATCAGCGC GGATACGGTC CCAGGAGATTG TGCGACTTITA TACTGGACTT GTTGGCGTT
 1741 CGAACGTTGAA GCCCAGGSTAT ATTCTCGGAG CCCACCAAGC TTGTAAGCCC GCCCCCCTTA
 1801 CGATGCATTT ATTAGGGGTC CACAGACTAA ACTTGTTCCA AAGGTTATGG ATACCAGCAG
 1861 GAAAGTGACT TGCAATGCTGT TGTTCAAGCAG TACCGTGACA CCAAGTTCC GCTTGATGGG
 1921 TTGCATGTCG ATGTCGACTT TCAGGTAAAT GGCCCAGGTA TCGTTGAAGC TTTGGAGAAT
 1981 GCTAATTGTG CTCGTAAC TTAAGGACA ATTCAGAAC GTTTACCAACT AACCCGATTA
 2041 CGTTCCCTAA TCCCAGGAA ATGTTTACCA ATCTAAGGAA CAATGGAATC AAGTGTCCA
 2101 CCAACATCAC CCCTGTTATC AGTATCAGAG ATCGCCCCAA TGGGTACAGT ACCCTCAATG
 2161 AGGGATATGA TAAAAAGTAC TTCATCATGG ATGACAGATA TACCGAGGGG ACAAGTGGGG
 2221 ACCCGCAAAA TGTTCAAGTAC TCTTTTACG GCGGTGGAA CCCGGTTGAG GTTAACCTA
 2281 ATGATGTTTG GGCTCGGCCA GACTTTGGAG ACAATTAGTA AGTTACTCAA TAGGCTACTI
 2341 GAGATATTCT GTAGGTGGCA TTAACACGAC TATAGTGAATC TCCCTACGAA CTTCAACTGC
 2401 AAAGACTACC CCTATCATGG TGGTGTGAGT TACGGATATG GGAATGGCAC TGTAAGTGAT
 2461 AATAAGTCAT AAATACAACG TAATTATGG AGACTAATCA GTGGTAAATG AATTTAGCC
 2521 AGGTTACTAC CCTGACCTTA ACAGAGAGGA GGTTCAATC TGGTGGGAT TGCAGTACGA
 2581 GTATCTCTTC AATATGGGAC TAGAGTTGT ATGGCAAGAT ATGACAACCC CAGCGATCCA
 2641 TTCAATGTTGGAGACATGA AAGGGTTGCC CACCCGTCTG CTGTCACCG CCGACTCAGT
 2701 TACCAATGCC TCTGAGAAAA AGCTCGCAAT TGAAAGTTGG GCTCTTACT CCTACAACCT
 2761 CCATAAAGCA ACCTTCCACG GTCTTGGTCG TCTTGAGTCT CGTAAGAACAA AACGTAACCT
 2821 CATCCTCGGA CGTGGTAGTT ACGCCGGTGC CTATCGTTT GCTGGTCTCT GGACTGGAGA
 2881 TAACGCAAGT ACGTGGGAAT TCTGGAAGAT TTCGGTCTCC CAAGTTCTTT CTCTAGGTCT
 2941 CAATGGTGTG TGTATAGCGG GGTCTGATAC GGGTGGTTT GAGCCCGCAC GTACTGAGAT
 3001 TGGGGAGGAG AAATATTGCA GTCCGGAGCT ACTCATCAGG TGGTATACTG GATCATTCC
 3061 TTTGCCATGG CTTAGAAACC ACTACGTCAA GAAGGACAGG AAATGGTTCC AGGTAATATA

[図 15]

FIGURE 15 ~~図 15~~

3121 CTCTTCTGG TCTCTGAGTA TCGAAGACGC TAAGACAATA TAGGAACCAT ACGCGTACCC
 3181 CAAGCATCTT GAAACCCATC CAGAGCTCGC AGATCAAGCA TGGCTTTACA AATCTGTTCT
 3241 AGAAATTGTC AGATACTGGG TAGAGCTAAG ATATTCCCTC ATCCAGCTCC TTTACGACTG
 3301 CATGTTCCAA AACGTGGTCG ATGGTATGCC ACTTGCCAGA TCTATGGTAT GCATTTTATC
 3361 CGTCTCCTT CACGATAATG CACCAAGTCTA ACCGAATTT CTTTAGCTC TTGACCGATA
 3421 CTGAGGATAC GACCTTCTTC AATGAGAGCC AAAAGTTCT CGATAACCAA TATATGGCTG
 3481 GTGACGACAT CCTTGATGCA CCCATCCTCC ACAGCCGTAA CGAGGTTCCG GGAGAGAAC
 3541 GAGATGTCTA TCTCCCTCTA TTCCACACCT GGTACCCCTC AAACTTGAGA CGTGGGACG
 3601 ATCAGGGAGT CGCTTTAGGG AATCCTGTG AAGGTGGCAG CGTTATCAAC TACACTGCCA
 3661 GGATTGTTGC CCCAGAGGAT TATAATCTCT TCCACAAACGT GGTGCCGGTC TACATCAGAG
 3721 AGGGTAAGCG ATGGAATAAT TTCTTGCAAG TTCCAGATAC AAGTGGTTAC TGACACCTTA
 3781 AACCAGGTGC CATCATTCCG CAAATTCAAGG TACGCCAGTG GATTGGCGAA GGAGGGCCTA
 3841 ATCCCCATCAA GTTCAATATC TACCCCTGGAA AGGACAAGGT ATATTCTCCA TGACTATCGC
 3901 GCATTTATTC TTCTCTACT CSCACTAATC TCATCTGAAT ATAGGAGTAT GTGACGTACC
 3961 TTGATGATGG TGTTAGCCGC GATAGTGCAC CAGATGACCT CCCGCAGTAC CGCGAGGCCT
 4021 ATGAGCAAGC GAAGGTGCGAA GGCAAAGACG TCCAGAAGCA ACTTGCAGTC ATTCAAGGG
 4081 ATAAGACTAA TGACTTCTCC GCCTCCGGGA TTGATAAGGA GGCAAAGGGT TATCACCGCA
 4141 AAGTTTCTAT CAAACAGGTA CATGATTCTA TCTTCTTTT TTGCGAGTCA CTATTATATC
 4201 ATCCTAACAT TGCTTCTCTT ATTTAAAAGG AGTCAAAAGA CAAGACCCGT ACTGTCACCA
 4261 TTGAGCCAAA ACACAACGGA TACGACCCCT CTAAGGAAGT TGGTAATTAT TATACCATCA
 4321 TTCTTGGTA CGCACCGGGC TTTGACGGCA GCATCGTCGA TGTGAGCCAG GCGACCGTGA
 4381 ACATCGAGGG CGGGGTGGAA TGCAGAAATT TCAAGAACAC CGGCTTGCAT ACGGTTGTAG
 4441 TCAACGTGAA AGAGGTGATC GGTACCAACAA AGTCCGTCAA GATCACTTGC ACTACCGCTT
 4501 AGAGCTCTTT TATGAGGGGT ATATGGAGT GGCAGCTCAG AAATTTGGGA AGCTTCTGGG
 4561 TATTCCCTTT GTTTATTTAC TTATTATTG AATCGACCAA TACGGGTGGG ATTCTCTCTG
 4621 GTTTTGTGA GGCTATGTT TACTTGGTCT GAAAATCAAAT TTGCGTTCTCA

【 図 1 6 】

FIGURE 16

MC - MAGFSDPLNFCKAEDYYVALDWKGPKQKIIGVDTTPKSTKFPKNWHGVN -50
 :
 MV - MAGLSDPLNFCKAEDYYAAAKGWGSPQKIIIRDQTPPQGTKDPKSWHAVN -50
 MC - LRFDDGTLGVVQFIRPCVWRVRYDPGFKTSDEYGENTRTIVQDYMSTLS -100
 :
 MV - LPFDDGTMVVQFVRPCVWRVRYDPSVKTSDEYGENTRTIVQDYMSTLV -100
 MC - NKLDTYRGLTWETKCEDSGDFFTFSKVTAVEKSERTRNKVGDGLRIHLW -150
 : : . :
 MV - GNLDIFRGLTWVSTLEDSGEYYTFKSEVTAVDETERTRNKVGDGLKIYLW -150
 MC - KSPFRIQVVRTLPLKDPPPIPNVAAAEARVSDKVVWQTSPKTFRKNLHP -200
 :
 MV - KNPFRQVVRLLTPLVDPPPIPNVANATARVADKVVWQTSPKTFRKNLHP -200
 MC - QHKMLKDTVLDIVKPGHGEYVGWGEEMGGIQFMKEPTFMNYFNFDNMQYQQ -250
 :
 MV - QHKMLKDTVLDIICKPGHGEYVGWGEEMGGIEFMKEPTFMNYFNFDNMQYQQ -250
 MC - VYAQGALDSREPLYHSDFYLDVNSNPEHKNITATFIDNYSQIAIDFGKT -300
 :
 MV - VYAQGALDSREPLYHSDFYLDVNSNPEHKNITATFIDNYSQIAIDFGKT -300
 MC - NSGYIKLGTRYGGIDCYGISADTVPEIVRLYTGLVGRSKLKPRYILGAHQ -350
 :
 MV - NSGYIKLGTRYGGIDCYGISADTVPEIVRLYTGLVGRSKLKPRYILGAHQ -350
 MC - ACYGYQQESDLYSVVQQYRDCKFPLDGIVHDVDVQDGFRFTTNPHTFPN -400
 :
 MV - ACYGYQQE\$DLHAVVQQYRDCKFPLDGLHVDDFQDNFRFTTNPITFPN -400
 MC - PKEMFTNLRNNGIKCSTNITPVISINNREGGSTLLEGVDKKYFIMDDRY -450
 :
 MV - PKEMFTNLRNNGIKCSTNITPVISIRDRPNGYSTLNEGYDKKYFIMDDRY -450
 MC - TEGTSGNAKDVRYYGGGNKVEVDPNVDNRPDFKDNYDFPANFSKQY -500
 :
 MV - TEGTSGDPQNVRYSFYGGGNPVEVNPNPDVWARPDFGDNYDFPTNFNCNDY -500
 MC - PYHGGVSYGYGNGSAGFYPDLNRKEVRIWWGMQYKYLFDMGLEFVWQDMT -550
 :
 MV - PYHGGVSYGYGNGTPGYYPDLNREEVRIWWGLQYEYLFNMGLEFVWQDMT -550
 MC - TPAIHTSYGDMKGLPTRLLVTSDSVTNASEKKLAIETWALYSYNLHKATW -600
 :
 MV - TPAIHSSYGDMKGLPTRLLVTADSVTNASEKKLAIIESWALYSYNLHKATF -600

[図 1 6]

FIGURE 16 等

MC - HGLSRLESRKRNKRNFILGRGSYAGAYRFAGLWTGDNASNWEFWKISVSQV -650
 ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::
 MV - HGLGRLESRKRNKRNFILGRGSYAGAYRFAGLWTGDNASTWEFWKISVSQV -650
 MC - LSLGLNGVCIAAGSDTGGFEPYRDANGVEEKYCSPELLIRWYTGSFLLPWL -700
 ::::::::::::::::::::: . . :::::::::::::::::::::
 MV - LSLGLNGVCIAAGSDTGGFEPAR-TEIGEEKYCSPELLIRWYTGSFLLPWL -699
 MC - RNHYVKKDRKFQEPYSYPKHLETHPELADQAWLYKSVLEICRYYVELRY -750
 :::::::::::::::::::::
 MV - RNHYVKKDRKFQEPYAYPKHLETHPELADQAWLYKSVLEICRYWVELRY -749
 MC - SLIQLLYDCMFQNVVVGMPITRSMLLTDTEDEFFNESQKFLDNQYMGD -800
 :::::::::::::::::::::
 MV - SLIQLLYDCMFQNVVVGMPITRSMLLTDTEDEFFNESQKFLDNQYMGD -799
 MC - DILVAPILHSRKEIPGENRDVYLPLYHTWYPSNLRPWDDQGVALGNPVEG -850
 :::::::::::::::::::::
 MV - DILVAPILHSRNEVPGENRDVYLPLFHTWYPSNLRPWDDQGVALGNPVEG -849
 MC - GSVINYTARIVAPEDYNLFHSVVVPVVREGAIIPQIEVRQWTGQGGANRI -900
 ::::::::::::::::::::: : : : : :
 MV - GSVINYTARIVAPEDYNLFHNVVVPVYIREGAIIPQIQVRQWIGEGGPNI -899
 MC - KFNIYPGKDKEYCTYLDGVSRDSAPDDLPQYKETHEQSKVEGAEIAKQI -950
 :::::::::::::::::::::
 MV - KFNIYPGKDKEYVTYLDGVSRDSAPDDLPQYREAYEQAKVEGKDVQKQL -949
 MC - G-----KKTGYNISGTDPEAKGYHRKVAVTQTSKDKTRTVTIEPKHNGYD -995
 : .
 MV - AVIQGNKTNDFSASGIDKEAKGYHRKVSINKQESKDKTRTVTIEPKHNGYD -999
 MC - PSKEVGDYYTIILWYAPGFDSIVDVSKTTVNVEGGVEHQVYKNSDLHTV -1045
 :::::: .
 MV - PSKEVGNYYTIILWYAPGFDSIVDVSQATVNIEGGVECEIFKNTGLHTV -1049
 MC - VIDVKEVIGTTKSVKITCTAA -1066
 .
 MV - VVNVKEVIGTTKSVKITCTTA -1070

[図 17]

FIGURE 17

MAGFSDPLNF CKAEDYYNSVA LDWKGPQKII GVDTPPKST KFPKNWHGVN LRFDDGTLGV VQFIRPCVWR
 VRYDPGFCTS DEYGDENTRT IVQDYMSTLS NKLDTYRGLT WETKCEDSGD FFTFSSKVTA VEKSERTRNK
VGDGLRIHLW KSPFRIQVVR TLTPLKDPYP IPNVAAAEAR VSDKVVWQTS PKTFRKNLHP OHKMLKDTVL
DIVKPGHGEY VGWGEMGGIQ FMKEPTFMNY FNFDNMQYQQ VYAQGALDSR EPLYHSDPFY LDVNSNPEHK
NITATFIDNY SQIAIDFGKT NSGYIKLGTR YGGIDCYGIS ADTVPEIVRL YTGLVGRSKL KPRYILGAHQ
ACYGYQQESD LYSVVQQYRD CKFPLDGIV DVDVQDGFR FTTNPHTFPN PKEMFTNLRN NGIKCSTNIT
PVISINNREG GYSTLLEGVD KKYFIMDDRY TEGTSGNAKD VRYMYYGGGN KVEVDPNDVN GRPDFKDNYD
FPANFNSKQY PYHGGVSYGY GNGSAGFYPD LNRKEVRIWW GMQYKYLDFM GLEFWWQDMT TPAIHTSYGD
MKGLPTRLLY TSDSVTNASE KKLAETWAL YSYNLHKATW HGLSRLESRK NKRNFILGRG SYAGAYRFAG
LWTGDNASNW EFWKISVSQV LSLGLNGVCI AGSDTGGFEP YRDANGVEEK YCSPELLIRW YTGSFLLPWL
RNHYVKKDRK WFQEPIYSYK HLETHPELAD QAWLYKSVLE ICRYYYVELRY SLEQLLYDCM FQNVVQGMPI
TRSMLLTDTE DTTFFNESQK FLDNQYMAGD DILVAPILHS RKEIPGENRD VYLPLYHTWY PSNLRPWDQQ
GVALGNPVEG GSVINYTARI VAPEDYNLFH SVVPVYVREG AIIPQIEVRQ WTGQGGANRI KFNIYPGKDK
EYCTYLDGKV SRDSAPEDLP QYKETHEQSK VEGAELAKQI GKKTGYNISG TDPEAKGYHR KVAVTQTSKD
KTRTVTIEPK HNGYDPSKEV GOYYTIILWY APGFQDGSIVD VSKEVTVNVEG GVEHQVYKNS DLHTVVVIDVK
EVIGTTKSVK ITCTAA

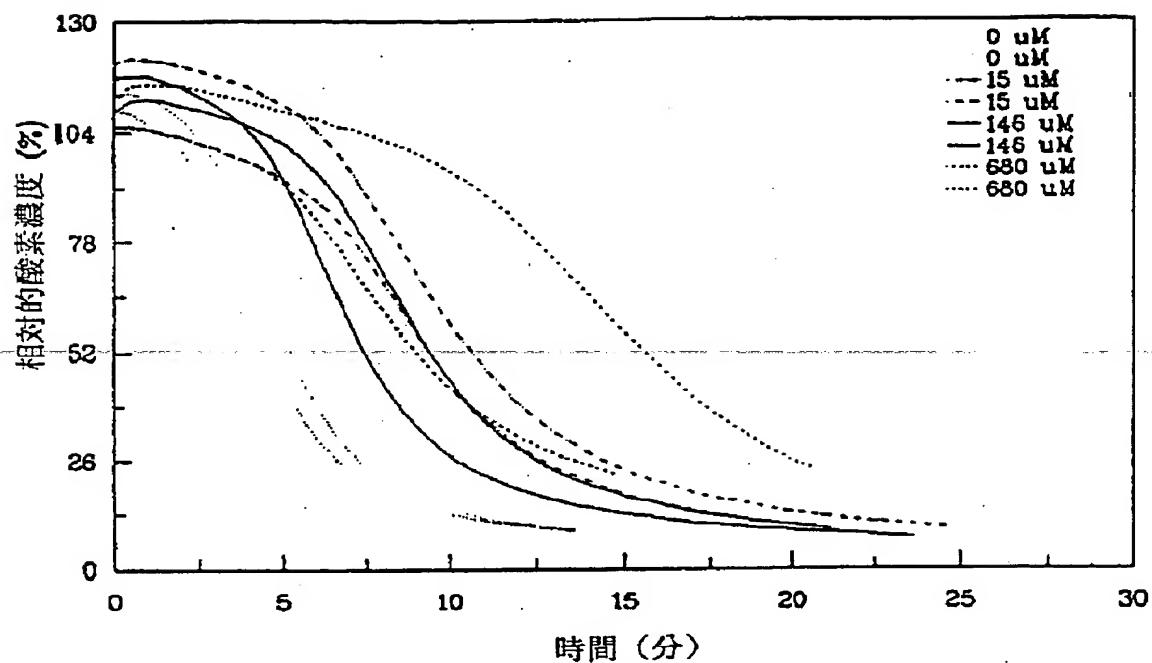
[図 18]

FIGURE 18

MAGLSDPLNF RKAEDYYAAA KGWSGPQKII RYDQTTPPQGT KDPKSWHAVN LPFDDGTMCV VQFVRPCVWR
 VRYDPSVKTS DEYGDENTRT IVQDYMSTLV GNLDIFRGLT WVSTLEDSE YYTFKSEVTA VDETERTRNK
VGDGLKJYLW KNPFRIQVVR LLTPLVDPFP IPNVANATAR VADKVVWQTS PKTFRKNLHP QHKMLKDTVL
DIIKPGHGEY VGWGEMGGIE FMKEPTFMNY FNFDNMQYQQ VYAQGALDSR EPLYHSDPFY LDVNSNPEHK
NITATFIDNY SQIAIDFGKT NSGYIKLGTR YGGIDCYGIS ADTVPEIVRL YTGLVGRSKL KPRYILGAHQ
ACYGYQQESD LHAVVQQYRD TKFPLDGLHV DVDFQDNFR FTTNPITFPN PKEMFTNLRN NGIKCSTNIT
PVISIRDPRN GYSTLNEGVD KKYFIMDDRY TEGTSGDPON VRYSFYGGGN PVEVNPNDVW ARPDFGDNYD
FPTNFNCKDY PYHGGVSYGY GNGTPGYYPD LNREEVRIWW GLQYEYLFNM GLEFWWQDMT TPAIHSSYGD
MKGLPTRLLV TADSVTNASE KKLAIESWAL YSYNLHKATF HGLGRLESRK NKRNFILGRG SYAGAYRFAG
LWTGDNASTW EFWKISVSQV LSLGLNGVCI AGSDTGGFEP ARTEIGEEKY CSPELLIRWY TGSFLLPWL
NHYVKKDRKW FQEPIYAPKH LETHPELADQ AWLYKSVLEI CRYWVELRYS LIQQLLYDCMF QNVVQGMPLA
RSMLLTDTED TTFFNESQKFL LDNOYMAQDD ILVAPILHSR NEVPGENRDV YLPLFHTWYP SNLRPWDDQG
VALGNPVEGG SVINYTARI APEDYNLFHN VVPVYIREGA IIPQIQRQW IGEGGPNPIK FNIYPGKDK
YVTYLDGVS RDSAPDDLPQ YREAYEQAKV EGKDVQKQLA VIQGNKTNDF SASGIDKEAK GYHRKVSINK
ESKDKTRTVT IEPKHNGYDP SKEVGNYYTI ILWYAPGFQDG SIVDVSQATV NIEGGVEEI FKNTGLHTVV
VNVKEVIGTT KSVKITCTTA

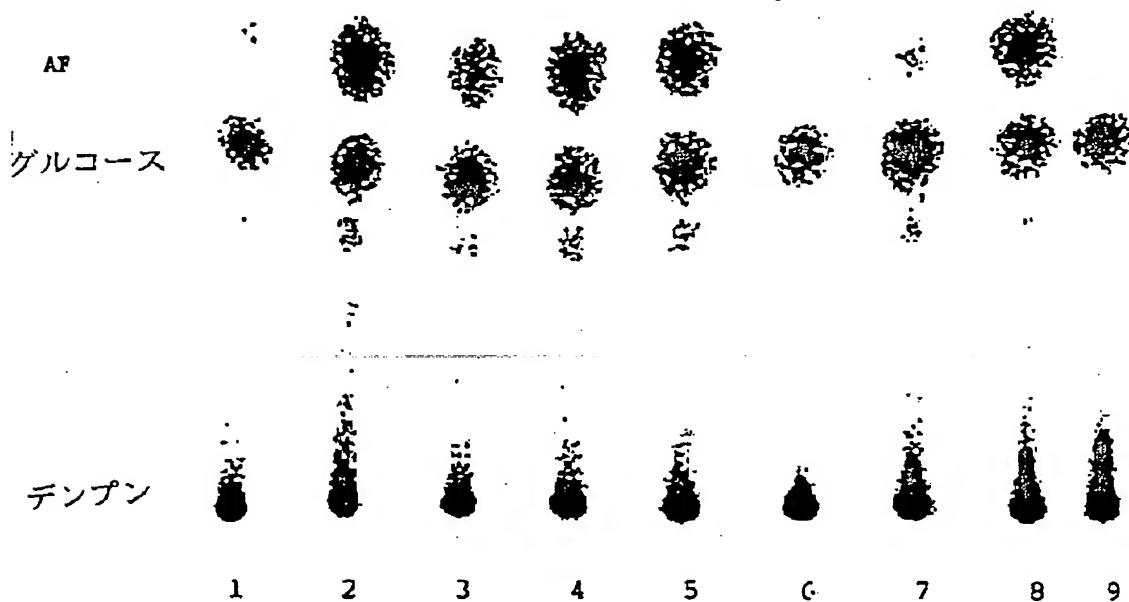
【図 19】

FIG 19



[図 20]

Fig. 20



[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In Original Application No
PCT/EP 94/03397

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/60 C12N9/88 C12P19/02 C07H3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C12P C07H C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | FR,A,2 617 502 (SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE) 6 January 1989 cited in the application see page 2, line 13 - page 3, line 26 see page 4, line 7 - line 35 see page 5, line 16 - page 6, line 26 -/- | 1,5,6, 15-17,19 |

 Further documents are listed in the continuation of box C. Parent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 1995

Date of mailing of the international search report

29.06.95

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.O. 5813 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 94/03397

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1156, no. 3, 1993 pages 313-320,</p> <p>SHUKUN YU ET AL. 'Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds' cited in the application see abstract see page 314, left column, paragraph 3 - page 315, left column, paragraph 1 see page 315, right column, paragraph 3 - page 316, right column, paragraph 1 ----</p> | 1,6-8 |
| A | <p>BULL. SOC. PHARM. BORDEAUX, vol. 128, no. 1-4, 1989 pages 9-18,</p> <p>MME. M.A. BAUTE ET AL. 'Bioconversions fongiques produisant, à partir de sucres, des composés pyroniques inhabituels à activité antibiotique' see page 13, paragraph 1 - paragraph 8</p> | 1,6 |
| A | <p>EP,A,0 177 477 (REGION WALLONNE) 9 April 1986 see page 1, line 10 - line 22 ----</p> | 21 |
| P,X | <p>PLANTA, vol. 191, no. 1, 1993 pages 137-142,</p> <p>SHUKUN YU ET AL. 'Alpha-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen-degrading enzyme' see page 137, left column, paragraph 1 see page 137, right column, paragraph 3; figures 4A,B ----</p> | 1,6,7 |
| P,X | <p>WO,A,94 09122 (ALGATECH AB) 28 April 1994 see page 1, line 6 - line 26 see page 2, line 16 - page 3, line 5 see page 3, line 18 - page 5, line 30 see page 8, line 17 - line 25 see page 9, line 1 - line 20 see page 10, line 37 - page 11, line 8 see page 11, line 26 - page 12, line 35 see page 16, line 29 - line 35 see page 28, line 10 - page 30, line 33 -----</p> | 1-8, 15-17, 19,21 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|-------------------------------|
| International application No. |
| PCT/EP 94/03397 |

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1.- claims 1-19: 1',4-D-Anhydrofructose and method for its preparation
- 2.- claims 20: Method to increase stability and activity of glucan lyase.
- 3.- claims 21: Use of anhydrofructose as anti-oxidant.
- 4.- claims 22: Use of anhydrofructose as sweetener.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-20

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|------------------------------|
| International Application No |
| PCT/EP 94/03397 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| FR-A-2617502 | 06-01-89 | NONE | | |
| EP-A-177477 | 09-04-86 | BE-A- | 900679 | 16-01-85 |
| WO-A-9409122 | 28-04-94 | AU-B- SE-A- | 5347094 9203084 | 09-05-94 22-04-94 |

フロントページの続き

(51) Int.Cl. * 識別記号 庁内整理番号 F I

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:685)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:90)

(C 1 2 N 9/88

C 1 2 R 1:84)

(31) 優先権主張番号 9 3 2 1 3 0 3 . 1

(32) 優先日 1993年10月15日

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(31) 優先権主張番号 9 3 2 1 3 0 4 . 9

(32) 優先日 1993年10月15日

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(31) 優先権主張番号 9 3 2 1 3 0 5 . 6

(32) 優先日 1993年10月15日

(33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M
C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G
, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N,
T D, T G), A P (K E, M W, S D, S Z), A M,
A T, A U, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C
N, C Z, D E, D K, E S, F I, G B, G E, H U
, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L K, L T,
L U, L V, M D, M G, M N, M W, N L, N O, N
Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S I, S K
, T J, T T, U A, U S, U Z, V N(72) 発明者 クラフ, カーステン マシアス
デンマーク国 ヴィビー ジェイ ディー
ケイ-8260, スターブトラブベ 139 エ
イ(72) 発明者 ボジコ, マジャ
デンマーク国 ゲントフテ ディーケイー
2820, フラグトバーケン 11(72) 発明者 ニールセン, ジョン
デンマーク国 コベンハーゲン エス デ
ィーケイー2300, エングベ 38(72) 発明者 マーキュセン, ジャン
デンマーク国 コベンハーゲン ケイ デ
ィーケイー1210, 2., クナプロストラエ
ド 25(72) 発明者 クリストセン, トーブ マーテル イー
ダ エルサ
デンマーク国 アレロッド ディーケイー
3450, ソエンゲン 30

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.